

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Katedra Experimentální biologie rostlin

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Eliška Škrabálková

Charakterizace funkce genu AHL28 a jeho vliv na vývoj kořenového systému


Functional characterisation of AHL28 and its role in root system development

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Marek Šírl

Konzultant: RNDr. Aleš Soukup, PhD

Praha, 2020

Poděkování: Všem, co mi pomohli, dík. E 

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 08. 06. 2020

Podpis

Obsah

1.	Abstrakt	1
2.	Abstract	2
3.	Seznam použitých zkratk.....	3
4.	Úvod.....	5
5.	Cíle	6
6.	Přehled literatury	7
6.1.	Genová rodina <i>AHL</i>	7
6.1.1.	Strukturní části proteinu	7
6.1.2.	Fylogenetická struktura rodiny <i>AHL</i>	8
6.1.3.	Funkce	9
6.1.3.1.	Vývoj kořenového systému a jeho propojení s <i>AHL</i>	10
6.1.3.2.	Vliv <i>AHL</i> na morfologii a vývoj prýtu	12
6.1.3.3.	Vliv <i>AHL</i> na kvetení.....	14
6.1.3.4.	Funkce <i>AHL</i> za podmínek stresu.....	14
7.	Materiál a metody.....	16
7.1.	Rostlinný materiál.....	16
7.2.	Extrakce DNA pomocí izopropanolové precipitace	17
7.3.	Polymerázová řetězová reakce	17
7.4.	Gelová agarózová elektroforéza	19
7.5.	Křížení	20
7.6.	GUS detekce	20
7.7.	Kvantitativní zhodnocení makroskopické struktury kořenového systému.....	21
7.8.	Statistické vyhodnocení výsledků	21
7.9.	Barvení rostlin propidium jodidem.....	22
7.10.	Transformace rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
7.11.	Mikroskopie.....	27
7.12.	qPCR.....	28

8.	Výsledky.....	30
8.1.	Lokalizace <i>AHL28</i>	30
8.1.1.	Lokalizace transkripce.....	30
8.1.2.	Lokalizace proteinu	32
8.2.	Vliv modulace exprese <i>AHL28</i> na kořenový systém.....	33
8.3.	Vliv <i>AHL28</i> na iniciaci postranních kořenů	39
8.3.1.	Vliv modulace exprese <i>AHL28</i> na počet iniciací postranních kořenů.....	39
8.4.	<i>AHL28</i> a jeho reakce na auxin.....	45
8.4.1.	Vliv auxinu na kořenový systém rostlin s modulovanou expresí <i>AHL28</i>	45
8.4.2.	Míra exprese <i>AHL28</i> v použitých liniích	48
8.4.3.	Výsledky křížení	48
9.	Diskuze.....	50
9.1.	Míra exprese <i>AHL28</i> v použitých liniích	50
9.2.	Funkce <i>AHL28</i> jako regulátoru vývoje primárního kořene.....	51
9.3.	Tvorba postranních kořenů pod vlivem <i>AHL28</i>	54
9.4.	Funkce <i>AHL28</i> při tvorbě vodivých pletiv	57
9.5.	Plánované navazující experimenty	60
10.	Závěr.....	61
11.	Použitá literatura	62

1. Abstrakt

Architektura kořenového systému vzniká na základě interakce mnoha faktorů. Jedním z nich je i specifická exprese genů, jež se na vývoji kořene podílejí. Nedávno objevená genová rodina *AHL*, jež se svými vlastnostmi řadí mezi transkripční modulátory, prokazatelně obsahuje členy, kteří se podílejí na regulaci struktury a vývoje kořenového systému.

Dosud funkčně necharakterizovaný gen *AHL28* je jedním členem této rodiny, který se regulace účastní. Tomu odpovídá exprese *AHL28* a to jak na úrovni aktivity promotoru, tak i samotného jaderně lokalizovaného proteinu. Jeho přítomnost jsme pozorovali v buňkách primární kůry přechodové zóny primárního i postranního kořene. Fenotypové analýzy kořenového systému rostlin s rozdílnou hladinou transkriptu *AHL28* ukazují vliv tohoto genu na růst primárního kořene, velikost apikálního meristému a tvorbu bočních kořenů. Dále se *AHL28* účastní regulace vzniku a vývoje vodivých pletiv.

Klíčová slova: *AHL*, jaderný protein, kořenový systém, apikální meristém, postranní kořeny, xylém, *Arabidopsis thaliana*

2. Abstract

The root system architecture development is influenced by the interaction of numerous factors, one of which is the specific gene expression contributing to root development. The recently discovered *AHL* gene family, which, due to its characteristics act as transcriptional modulators, demonstrably comprises members taking part in regulation of root system development.

Hereby we report the *AHL28* gene that participates in this process. Its regulatory role corresponds with the expression pattern, regarding both the promotor activity and presence of nuclear localised protein. The expression can be observed in the cortex cells of transition zone of both primary and lateral roots. The phenotypic analysis of plants with modulated level of *AHL28* transcription demonstrates its role in the primary root growth and differentiation, the apical meristem size and the number of lateral roots. Moreover, the gene also plays a role in vascular tissue patterning.

Key words: AHL, nuclear protein, root system, apical meristem, lateral roots, xylem, *Arabidopsis thaliana*

3. Seznam použitých zkratk

AHL	AT-HOOK MOTIV NUCLEAR LOCALIZED
PPC	Plant and Procaryote conserved domain
HMG	high mobility group protein
MAR	matrix attachment region
TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
Aux/IAA	INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
ESC/ORE7	ESCAROLA/ ORESARA 7/AHL27
SOB#3	SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME B-4 #3
YUC9	YUCCA9
ARP4	ACTIN-RELATED PROTEIN 4
SWR1	SWI/SNF2-RELATED 1
BZR1	BRASSINAZOLE-RESISTANT 1
SAUR19	SMALL AUXIN UP RNA19
PIF	PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR
BBM	BABY BOOM
2,4D	kyselina dichlorfenoxycetová
GIK	GIANT KILLER/AHL21
AG	AGAMOUS
CRC	CRABS CLAW
JAG	JAGGED
KNU	KNUCKLES
ETT	ETTIN
FT	FLOWERING LOCUS T
TEK	TRANSPOSABLE ELEMENTS SILENCING VIA AT-HOOK/AHL16
AGP6	ARABINOGLYCAN PROTEIN 6
FLC	FLOWERING LOCUS C
TE	transpozibilní elementy
NHO1	NONHOST RESISTANCE TO P. S. PHASEOLICOLA 1
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
STM	SHOOT MERISTEMLESS
HAI1	HIGHLY ABA-INDUCED 1
HM	homozygotní
HZ	heterozygotní
WT	původní genotyp
RDR6	RNA dependentní RNA polymeráza 6
MS	Murashige and Skoog Basal Salt Mixture
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
PCR	polymerázová řetězová reakce

TAE.....	tris-acetát-EDTA
GUS	β-glukuronidáza
DMSO.....	dimethylsulfoxid
NAA.....	kyselina 1-naftyloctová
AHK3.....	HISTIDINE KINASE 3
ARR	ARABIDOPSIS THALIANA RESPONSE REGULATOR
IAA3/SHY2	INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 3/SHORT HYPOCOTYL 2
PIN	PIN FORMED
AHP6	HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6
GAI	GIBBERELIC ACID INSENSITIVE
RGAR.....	REPRESSOR OF GA
ROS.....	reaktivní formy kyslíku
UPB1.....	UPBEAT1
IAA28	INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 28
ARF7.....	AUXIN RESPONSE FACTOR 7
IAA14/SLR1	INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 14/SOLITARY ROOT
ARF19.....	AUXIN RESPONSE FACTOR 19
LBD16/ASL18	LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN 16/ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE 18
LBD29/ASL16.....	LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN 29/ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE 16
IAA12/BDL	INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 12/BODENLOS
ARF5/MP.....	AUXIN RESPONSE FACTOR 5/MONOPTEROS
IPT	ISOPENTENYL TRANSFERASE
CKX.....	CYTOKININ OXIDASE
AHK.....	HISTIDINE KINASE
CLE.....	CLAVATA3/ESR-RELATED
SHR.....	SHORT ROOT
SCR.....	SCARECROW

4. Úvod

Kořen je nedílnou součástí rostlinného těla, jehož hlavními funkcemi je ukotvení rostliny v půdním prostředí, příjem vody a živin nebo navazování symbiotických vztahů. Zároveň podléhá během svého růstu mnoha vnitřním i vnějším faktorům. Regulace vývoje kořenového systému je dynamický proces probíhající na více úrovních, zahrnující fytohormonální signalizaci, reakce na okolní podmínky a vnitřní vývojový plán řízený genovou interakcí. Do procesu je zapojeno velké množství různých transkripčních faktorů, genových regulátorů, fytohormonů a jiných signálních molekul.

Jedním z potenciálních regulátorů je rodina *AHL* genů kódující malé jaderné proteiny, jež mají funkci transkripčních faktorů a modulátorů chromatinové struktury. Jedná se o poměrně nově popsanou skupinu genů účastnící se kontroly vývoje rostlinného těla v různých oblastech i úrovních. Genom modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* obsahuje 29 paralogních členů, z nichž většina nebyla dosud funkčně popsána a pokud byla, tak většinou ve spojení s vývojem nebo procesy udávajícími se v nadzemní části rostliny.

Na základě expresních dat, bylo zjištěno, že gen příslušící do této rodiny, *AHL28*, má pravděpodobně svoji expresní doménu v kořenovém systému. Naším úkolem, tedy bylo ověřit tyto informace a následně více specifikovat jeho lokalizaci a působení na vývoj architektury kořenového systému.

5. Cíle

- Určení místa transkripce a přítomnosti proteinu *AHL28* v kořeni pomocí vytvořených transgenních linií.
- Analýza změn architektury kořenového systému u rostlin s modulovanou expresí *AHL28*.

6. Přehled literatury

6.1. Genová rodina *AHL*

Genová rodina *AHL* (*AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALISED*) je skupina malých jaderných proteinů, specifická pro suchozemské rostliny (Fujimoto et al., 2004). U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* tvoří rodinu *AHL* genů 29 paralogních členů (Fujimoto et al., 2004; Zhao et al., 2013).

AHL proteiny jsou transkripčními modulátory působícími na několika úrovních. Fyzická interakce s jadernou laminou umožňuje přímou fyzickou remodelaci chromatinu (Zhao et al., 2013). Dále pak modifikují genovou expresi tím, že zprostředkují specifické úseky DNA histon modifikujícím enzymům, jako jsou deacetylázy či methyltransferázy (Yun et al., 2012). AHL proteiny působí také jako transkripční faktory, jelikož mají schopnost vazby do promotorové či kódující sekvence genů a tím přímo regulují jejich aktivitu, a zároveň samy fyzicky interagují s jinými transkripčními faktory (Zhao et al., 2013).

6.1.1. Strukturní části proteinu

Geny *AHL* ve své sekvenci kódují dvě základní domény budoucího proteinu - AT-hook a PPC (Plant and Prokaryote conserved domain).

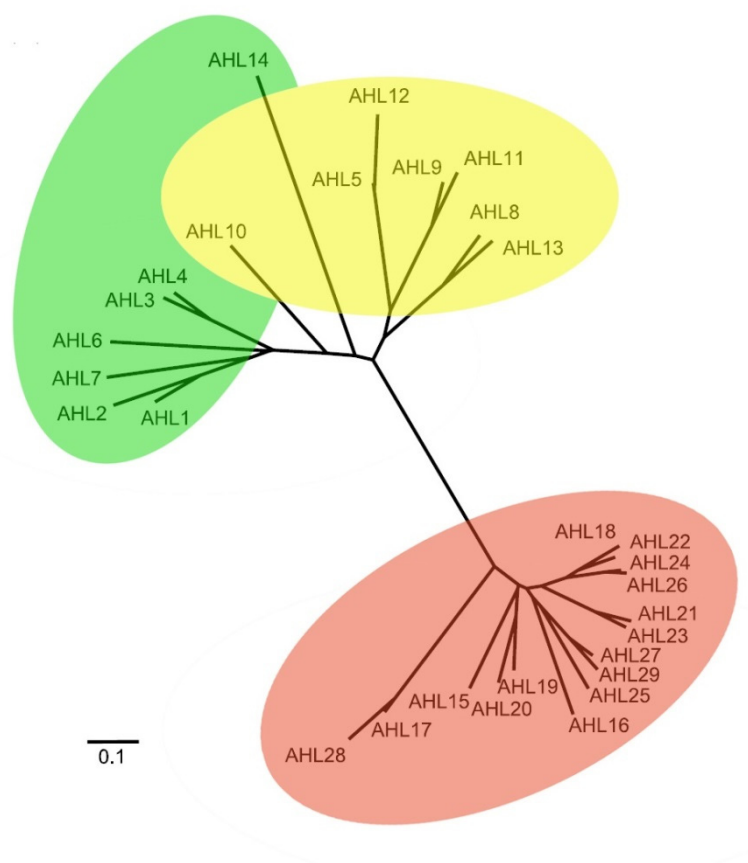
AT-hook motiv byl prvně objeven v savcích buňkách u skupiny high mobility group proteinů (HMG), a následně byl popsán u dalších zástupců eukaryot ale i prokaryot. (Aravind and Landsman, 1998; Gupta et al., 1998; Reeves and Nissen, 1990). Primární funkcí AT-hook motivu je vazba do AT bohatých oblastí malého žlábků DNA, pomocí konzervované sekvence. Vazbou do MAR regionů (Matrix attachment region) DNA jsou proteiny obsahující tento motiv schopny modifikovat chromatinovou strukturu a vázat je s jadernou matrix (Aravind and Landsman, 1998; Fujimoto et al., 2004). AT-hook motiv, obsahuje konzervované jádro složené ze tří aminokyselin Arg-Gly-Arg a je dále na základě aminokyselin, které obklopují toto jádro z C konce rozdělen na dva typy. První typ se vyznačuje sekvencí Gly-Ser-Lys-Asn-Lys, kdežto u druhého typu se nachází sled aminokyselin Arg-Lys-Tyr-X (Zhao et al., 2013). Pokud dojde k narušení konzervované sekvence, ztrácí AHL svojí vazebnou schopnost (Huth et al., 1997; Zhao et al., 2013). Afinita AHL k DNA je přímo závislá na typu a počtu opakujících se AT-hook motivů (Zhao et al., 2013).

Na karboxylovém konci AT-hook motivu najdeme připojenou PPC doménu, která je známa i jako DUF296 (Domain of unknown function #296). PPC doména se vyskytuje jako samostatný protein v genomu prokaryot. Mezi eukaryoty byla její přítomnost potvrzena pouze

u rostlin, kde se vyskytuje právě v kombinaci s AT-hook doménou (Fujimoto et al., 2004). PPC je přibližně 120 aminokyselin dlouhá doména, jejíž terciální struktura byla definována jako β skládaný list, tvořený pěti vzájemně antiparalelními β řetězci, který obklopuje jeden α helix. Obsahuje mezidruhově konzervovanou sekvenci aminokyselin Gly-Arg-Phe-Glu-Ile-Leu, která je součástí jednoho β řetězce. Pokud dojde k narušení této konzervované sekvence, ztrácí AHL protein schopnost aktivovat transkripci a zároveň přichází o vazebnou funkci s jinými transkripčními faktory nebo proteiny jako jsou například histony (Zhao et al., 2013). PPC doména se stejně jako AT-hook motiv se dělí podle své aminokyselinové sekvence na začátku genu a v okolí konzervované sekvence na dva typy. Předpokládá se, že na základě analogie s prokaryotními PPC proteiny umožňuje tato doména tvorbu homo či hetero trimerů s ostatními členy rodiny AHL (Fujimoto et al., 2004; Lin et al., 2007; Zhao et al., 2014, 2013; Zhou et al., 2013). Dále je pak hydrofobní region této podjednotky zodpovědný za jadernou lokalizaci AHL proteinu (Fujimoto et al., 2004; Zhao et al., 2013).

6.1.2. Fylogenetická struktura rodiny *AHL*

Genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje 29 paralogních členů, kteří jsou dále na základě počtu a typu strukturních částí rozděleni na dvě třídy A a B (Obrázek 1). Třída A se vyznačuje hlavně tím, že neobsahuje introny a skládá se pouze z jednoho AT hook motivu a PPC domény, kdežto třída B má v sobě inkorporované introny a výsledný protein je tvořen PPC doménou a jedním či dvěma AT hook motivy. V závislosti na počtu a typu strukturních částí a také výskytu intronů můžeme vyvodit, že třída A je evolučně starší, a že následnými delečními či duplikačními událostmi se z ní vyvinula třída B, která pak nezávisle diverzifikovala (Fujimoto et al., 2004; Zhao et al., 2014, 2013).



Obrázek 1: Fylogenetický strom rodiny AHL. (Červená) třída A s AHL typu I, (žlutá) třída B s AHL typu-II, (zelená) třída B s AHL typu-III. (upraveno podle Fujimoto et al., 2004)

6.1.3. Funkce

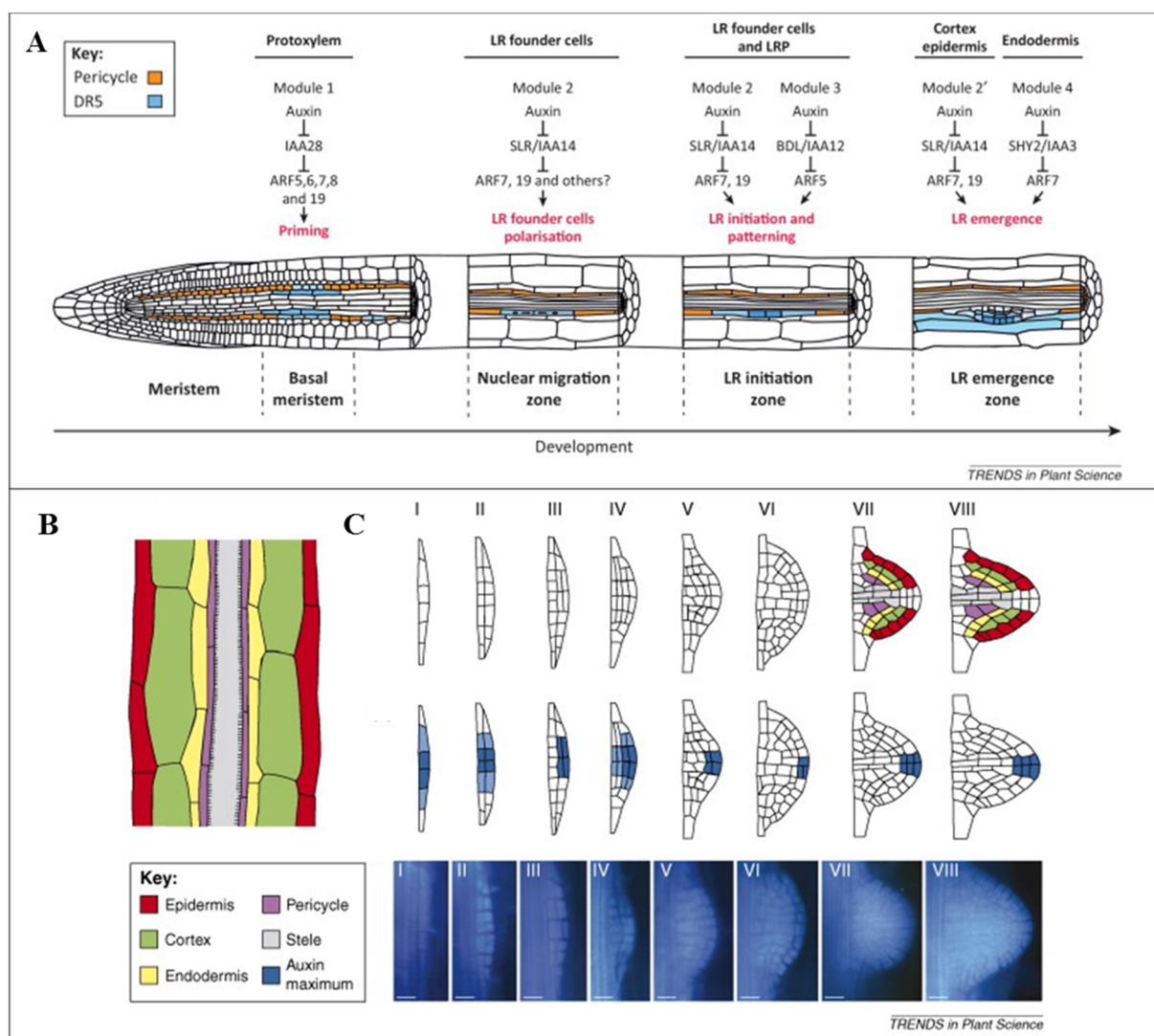
Rodina AHL je poměrně nedávno popsána skupina genů, tudíž není většina členů funkčně specifikována (Fujimoto et al., 2004). Doposud popsaní zástupci rodiny AHL se účastní morfologických změn nadzemní i podzemní části rostliny (Street et al., 2008; Zhou et al., 2013), modulace nástupu kvetení a senescence (Ng et al., 2009; Yun et al., 2012), biosyntézy fytohormonů (Matsushita et al., 2007) a fyziologické odpovědi na stresy (Yadeta et al., 2011). Mezi jednotlivými členy je zároveň předpokládána funkční redundance, jelikož vyřazením pouze jednoho genu z činnosti nedojde většinou u rostliny k na první pohled patrné fenotypové změně, což ale nevylučuje, že se rostlina může lišit od kontroly například v parametru, který nebyl zkoumán (Jeong et al., 2020; Jia et al., 2015; Karami et al., 2020; Lim et al., 2007; Lou et al., 2014; Matsushita et al., 2007; Ng et al., 2009; Street et al., 2008; Xu et al., 2013b; Yadeta et al., 2011; Yun et al., 2012; Zhou et al., 2013).

6.1.3.1. Vývoj kořenového systému a jeho propojení s *AHL*

Základ kořenového systému u *Arabidopsis thaliana* je tvořen primárním kořenem, který se dále větví a dává vzniknout kořenům postranním. Klíčovým místem pro růst primárního kořene je apikální meristém, jenž je centrem produkce nových buněk (Motte et al., 2019). Jádrem meristému jsou přibližně čtyři buňky klidového centra, které jsou obklopeny iniciálami a společně vytváří niky kmenových buněk (Clowes, 1954). Jednotlivé kořenové vrstvy vznikají z konkrétních iniciál, jež se dělí a produkují nové buňky, z nichž část přímo přiléhající ke klidovému centru si zachová statut iniciál a ostatní, které s ním ztratí kontakt, se dále plně diferencují do trvalých pletiv (Dolan et al., 1993). Buňky kořene projdou během svého života několika vývojovými stádii, které jsou v rámci kořene prostorově odlišeny, čímž vzniká zřetelná podélná zonace (Baluška et al., 1996; Pacheco-Escobedo et al., 2016). První, distálně umístěná je zóna meristematická, v níž procházejí buňky sérií mitotických dělení. Přímo na její bazální část navazuje zóna přechodová, kde dochází k fyziologickým změnám, které umožní buňkám přejít do další fáze, což je elongace. V elongační zóně se buňky výrazně prodlužují především v axilárním směru. Následuje zóna diferenciační, kde dochází ke zpomalení elongace a buňka nabývá své konečné podoby trvalého pletiva (Verbelen et al., 2016).

Vznik postranních kořenů neprobíhá v meristematické oblasti, ale *de novo* v kompetentním sektoru pericyklu, jenž u *Arabidopsis* přiléhá ke xylémovému pólu středního válce (Obrázek 2) (Dolan et al., 1993). Příslušné buňky pericyklu se nejprve asymetricky rozdělí a dají vzniknout zakladatelským buňkám. Ty následně projdou sérií antiklinálních a periklinálních dělení, čímž vznikne kořenové primordium, jež dále roste a proniká vrstvami mateřského kořene, až se vynoří a vytvoří postranní kořen (Obrázek 2) (Malamy and Benfey, 1997).

Výběr kompetentních buněk a prostorové rozmístění iniciací je regulováno auxinem (Dubrovsky et al., 2008; Péret et al., 2009). V přechodové zóně dochází k oscilaci pozitivní auxinové signalizace, což vede k primingu buněk pericyklu, během kterého získají potenciál k vytvoření iniciace. V zakladatelských buňkách se hromadí auxin, který svojí vazbou na receptor TIR1 spustí cílenou degradaci Aux/IAA proteinů, čímž aktivuje některé ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR), což vede k aktivaci dělení a tvorbě postranního kořene (Obrázek 2). Auxinové maximum se poté dále udržuje ve vrcholové části primordia, kde se posléze ustanoví meristém bočního kořene (Obrázek 2) (Lavenus et al., 2013; Péret et al., 2009). Auxinový gradient v kořeni je zároveň zodpovědný za širokou škálu dalších funkcí jako je pletivová diferenciaci, dlouhivý růst, gravitopická odpověď nebo tvorba kořenového vlášení (Lavenus et al., 2013; Overvoorde et al., 2010).



Obrázek 2: Vliv auxinu na vývoj postranních kořenů. (A) Působení jednotlivých transkripčních faktorů a auxinu na různé oblasti primárního kořene při vzniku iniciací. (B) Schéma primárního kořene a jeho jednotlivých buněčných vrstev. (C) Jednotlivé vývojové fáze primordií postranního kořene se zobrazenými auxinovými maximy (vyznačené modrou barvou). (A) Převzato z (Lavenus et al., 2013) (B, C) Převzato z (Péret et al., 2009)

V souvislosti s vývojem kořene je znalost funkce skupiny *AHL* velmi omezená. Jedny z mála *AHL* genů, jež byly v kořeni funkčně popsány, jsou dva sekvenčně blízce příbuzné geny *AHL3* a *AHL4*, které se podílejí na definování hranic xylému v rámci diferencujícího prokambia. Pokud dojde k vyřazení těchto genů z funkce, zapříčiní to vznik aditivních proto či metaxylémových cév v kořeni, což je pravděpodobně následkem narušení hranic mezi buněčnými typy středního válce. K transkripci *AHL3* dochází v buňkách endodermis a to zejména v elongační zóně kořene, ale protein se vyskytuje v prokambiu a xylémových prekurzorech v meristematické zóně. Podobný trend je pozorován u *AHL4*, jehož promotor byl aktivní v prokambiu mimo xylémovou desku, kdežto protein je přítomen v xylémových prekurzorech a v endodermis meristematické zóny. Oba tyto geny vykazují známky buněčné

neautonomního působení. Pokud dojde k vytvoření násobného mutanta, nedochází k výrazným fenotypovým změnám (Zhou et al., 2013).

Dalším členem AHL rodiny s popsáním vlivem na vývoj kořene je *AHL18* (Širl et al., 2020). V závislosti na míře exprese *AHL18* se mění délka meristematické zóny a také počet postranních kořenů. Inzerční mutant *ahl18* má výrazně kratší meristematickou zónu oproti rostlině nadprodukující tento gen. Jako příčina byla popsána rozdílná rychlost produkce buněk, která je u mutanta *ahl18* nižší. Počet bočních kořenů je při konstitutivní expresi navýšen a při vyřazení genu z funkce naopak snížen. Mutant *ahl18* má také více nevyvíjejících se kořenových primordiích ve větvené zóně kořene. Exprese *AHL18* probíhá v meristematické a elongační zóně s výjimkou klidového centra a stélé. V bazálnějších diferencovaných částech kořene je pouze v kompetentní části pericyklu. Přítomen je také v určitých fázích vývoje postranních kořenů (Širl et al., 2020).

6.1.3.2. Vliv AHL na morfologii a vývoj prýtu

AHL27, *ESC* (*ESCAROLA*) či *ORE7* (*ORESARA7*) a *AHL29 SOB#3* (*SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME B-4 #3*) jsou jedni z funkčně nejlépe popsaných členů rodiny AHL. Ektopické navýšení transkripce *AHL29* vede u rostliny k pomalejšímu vývoji celé listové růžice, ale po určitém čase dojde k rapidnímu zvětšení listů a květů oproti kontrole. Tento jev je způsoben intenzivní buněčnou proliferací při vývoji, což vede k navýšení počtu buněk, a když dojde následně k jejich expanzi, zapříčiní to zvětšení některých orgánů. Zároveň mají tyto rostliny oddálenou senescenci. Stejných fenotypových projevů je možné docílit i zvýšením exprese blízkého příbuzného *AHL27*, což podporuje myšlenku vzájemné funkční redundance mezi těmito paralogy. Při ztrátě jednoho nebo obou těchto genů, nebyla u dospělé rostliny pozorována změna fenotypu, kterou lze ale nalézt u klíčící rostlinky, kde oba proteiny regulují elongaci hypokotylu v závislosti na světelných podmínkách (Lim et al., 2007). U klíčících rostlin původního genotypu dojde při vystavení světlu k rapidnímu zastavení dlouhivého růstu ve tmě se vyvíjejícího etiolovaného hypokotylu (Serino and Deng, 2003). U jednoduchých mutantů *ahl27* a *ahl29* je tato odpověď částečně potlačena. U dvojitého mutanta *ahl27ahl29* je růst hypokotylu markantní i při působení světla. Oba proteiny fungují jako negativní regulátory elongace hypokotylu při přechodu z temnostního růstu do růstu za světelných podmínek a jsou zapojeni do světlem podmíněné signální kaskády (Lim et al., 2007; Street et al., 2008). Tuto dráhu ovlivňují na základě regulace biosyntézy auxinu. Jak *AHL27* tak *AHL29* se váží do promotorové oblasti genu *YUC9* (*YUCCA 9*) a pomocí interakce s *ARP4* (ACTIN-RELATED PROTEIN 4) podjednotkou proteinového komplexu *SWR1* (*SWI2/SNF2-RELATED 1*)

způsobí ATP dependentní výměnu histonu H2A za H2A.Z, což zapříčiní umlčení *YUC9*. Potlačení syntézy auxinu ukončí prodlužování hypokotylu. Odstraněním obou genů nedojde k zamezení syntézy auxinu, proto mutantní rostliny *ahl27ahl29* vykazují prodloužený hypokotyl na světle (Lee and Seo, 2017; March-Díaz and Reyes, 2009; Won et al., 2011). Na regulaci elongace hypokotylu se podílejí také brassinosteroidy, které jsou funkčně provázané s *AHL29*. Přímou interakcí transkripčního faktoru BZR1 a AHL29 dochází ke zvýšení exprese genů podrodiny *SAUR19* (*SMALL AUXIN UP RNA19*), která vede k modulaci délky hypokotylu (Favero et al., 2017, 2016). Ovlivněna je i délka listového řapíku na základě interakce AHL s transkripčními faktory PIF (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR). AHL29 se váže do stejné oblasti DNA jako transkripční faktory PIF, tím pádem nedojde k aktivaci transkripce genů indukovaných právě PIF faktory, což zapříčiní zkrácení délky řapíku (Favero et al., 2020).

AHL 15 je jedním z regulátorů buněčné pluripotence. Jeho exprese probíhá ve všech pletivech během vývoje rostlinného embrya. K navýšení exprese *AHL15* a jeho blízkých homologů *AHL19/20/29* dochází poté, co je somatická embryogeneze stimulována ektopickou expresí genu *BBM* (*BABY BOOM*), což prokazuje, že je jejich indukce podporována tímto genem. Při navýšení hladiny AHL15, vykazují rostliny nejprve pomalejší vývoj semenáčků, ale následně dochází na děložních listech k ektopickému vývoji somatických embryí i bez přítomnosti podpůrných fytohormonů jako je 2,4 D. Stejný fenotyp vykazují při navýšení exprese i blízké příbuzné homology *AHL19/20/29*. Rostliny, které se vyvinuly z takto vzniklých somatických embryí, mají větší nadzemní i podzemní orgány, a také mají zelenější prýt. AHL15 svým působením redukuje kondenzaci chromatinu, což může vést ke špatné segregaci chromozomů při buněčném dělení. V populaci s navýšenou expresí *AHL15* jsou poté výsledkem polyploidní jedinci s většími a zelenějšími listy (Karami et al., 2020).

V dospělé rostlině je AHL15 lokalizován v axilárních meristémech. Když vyřadíme tento gen z funkce, dojde k předčasné maturaci axilárních meristémů, tím pádem ke ztrátě jejich meristematické aktivity a rostlina produkuje méně větvená květenství a méně šesulí. Naopak při ektopické expresi dojde k oddálení kvetení a větší produkci listů, a přesto že jsou to rostliny jednoleté, tak vykazují známky víceletosti, jelikož po dozrání šesulí znovu vytvářejí nové listové růžice a pokračují v růstu. V těchto rostlinách zároveň dochází ke snížení exprese klíčových genů giberelinové syntézy, což nejspíše značí, že *AHL15* negativně ovlivňuje maturaci axilárních meristémů díky narušení produkce giberelinů. Stejné fenotypové znaky mají i overexpresní linie *AHL19/20/27/29* (Jeong et al., 2020).

6.1.3.3. Vliv *AHL* na kvetení

AHL21 známý také jako *GIK* (*GIANT KILLER*) je zapojen do signální dráhy vývoje květních orgánů. Podléhá regulaci genu *AG* (*AGAMOUS*) a podílí se na správné tvorbě reprodukčních orgánů. Zároveň upravuje funkčnost genů podílejících se na vývoji a diferenciaci květních orgánů *CRC* (*CRABS CLAW*), *JAG* (*JAGGED*), *KNU* (*KNUCKLES*) a *ETT* (*ETTIN*), u něhož se váže přímo do promotorové oblasti, čímž reguluje jeho expresi (Ng et al., 2009).

AHL22 se podílí společně s genem *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) na načasování doby kvetení. Pomocí zprostředkování vazby histonových deacetyláz a pravděpodobně i methyltransferáz moduluje chromatin a tím i reguluje transkripční funkci *FT* (Yun et al., 2012). Pokud vytvoříme rostlinu nadprodukující tento gen a necháme ji v podmínkách dlouhého dne, dojde u ní k pozdějšímu nástupu kvetení. Pokud byl prověřen fenotyp pouze jednoduchého mutanta v genu *AHL22*, nedocházelo ke změnám ve kvetení stejně jako u blízce příbuzných *ahl18*, *ahl27* a *ahl29*. Ale v případě vyřazení všech čtyř genů *AHL18/22/27/29* došlo k výskytu přesně opačného fenotypu zrychleného nástupu kvetení, z čehož lze také předpokládat vzájemnou redundanci mezi blízkými homology a také že všechny tyto geny se nějakým způsobem podílejí na modulaci doby nástupu doby kvetení (Xiao et al., 2009).

Zároveň má gen *AHL22* vliv i na vývoj hypokotylu, jelikož při jeho vyřazení dochází ke dlouhivému růstu stejně jako u dvojitého mutanta *ahl27ahl29* (Street et al., 2008). Předpokládá se, že *AHL22* kontroluje tuto elongaci hlavně na základě kooperace s PIF4 (Xiao et al., 2009). *AHL16* nebo také *TEK* (*TRANSPOSABLE ELEMENTS SILENCING VIA AT-HOOK*) je díky regulaci exprese některých extracelulárních arabinogalaktanových proteinů, hlavně AGP6 (ARABINOGLACTAN PROTEIN 6), klíčovým faktorem pro správnou tvorbu obalových vrstev pylu zejména exiny, na které je dále závislý následný vývoj funkčního pylového zrna (Jia et al., 2015; Lou et al., 2014). Geny *AHL* se také podílejí na udržení genomové integrity v rámci rostliny. Specificky *AHL16* svojí vazbou do regulační oblasti *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*) ovlivňuje míru účinnosti transpozibilních elementů (TE) přítomných v tomto regionu a tím udržuje funkční integritu genomu. Pokud snížíme aktivitu tohoto genu, ztrácí rostliny kontrolu nad TE, což zapříčiňuje fenotyp oddáleného kvetení. Předpokládá se, že *AHL16* funguje jako podjednotka většího bílkovinného komplexu, který se účastní remodelace DNA pomocí histon modifikujících enzymů (Xu et al., 2013a, 2013b, 2013c).

6.1.3.4. Funkce *AHL* za podmínek stresu

Některé *AHL* proteiny se podílejí na imunitní odpovědi při napadení rostliny patogenem. Pokud zvýšíme produkci *AHL20* dojde k potlačení tvorby obranných proteinů NHO1 (NONHOST RESISTANCE TO P. S. PHASEOLICOLA 1), které jsou aktivovány po identifikaci

takzvaných PAMPs (Pathogen associated molecular patterns), což jsou markery přítomnosti patogenu v organismu rostliny. I další blízké příbuzné *AHL15/19/27* vykazují podobné tendence regulátoru rostlinné imunity. (Lu et al., 2010). U *AHL19* bylo prokázáno, že při nadprodukci zvyšuje odolnost rostliny proti houbovým patogenům, jako je například *Verticillium* spp, ale mechanismus jeho přímého působení je doposud neznámý (Yadeta et al., 2011).

Aktivita genu *AHL10* je podmíněna jeho fosforylací, ke které dojde při stresu z nedostatku vody. Následně jsou ovlivněny dráhy kyseliny jasmonové, syntéza auxinu a vývojové regulátory jako *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*), což vede k tomu, že rostlina nenavýšuje biomasu listové růžice, jelikož omezí aktivitu apikálního meristému prýtu. Zároveň má na sobě tento gen vazebná místa pro fosfatázy HAI1 (HIGHLY ABA-INDUCED 1), jež hrají dosud málo popsanou roli při stresové signalizaci. Pokud je *AHL10* defosforylován, ztratí svoji funkci modulatoru chromatinové struktury a není schopen interagovat s jinými transkripčními faktory, což zapříčiní, že i během stresu suchem nezastavuje rostlina svůj růst. Rovnováha mezi aktivní a neaktivní formou určená HAI1 ovlivňuje výslednou reakci rostliny na stres (Wong et al., 2019).

Funkční charakterizace rodiny AHL je i kvůli počtu členů a jejich vzájemné redundanci doposud poměrně málo definovaná. Zároveň byly jejich schopnosti a fenotypové odlišnosti popsány ve většině případů v nadzemní části. Na základě volně dostupných expresních dat, jsme vybrali *AHL28*, jež je exprimované v kořeni a blíže definovali jeho vliv na vývoj kořenového systému.

7. Materiál a metody

7.1. Rostlinný materiál

K vypracování praktické části této diplomové práce byl použit modelový organismus *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col-0 a jeho jediné dvě veřejně dostupné inzerční linie v genu *AHL28* (<http://signal.salk.edu>, Tabulka 1). U T-DNA inzerčních linií byly pomocí PCR genotypování vyselektováni homozygotní (HM) mutanti a jejich původní genotyp (WT) (Kapitoly 7.2, 7.3, 7.4)

gen	kód genu	linie	místo inzerce T-DNA
<i>AHL28</i>	At1g14490	SAIL_646_A02	5' UTR
<i>AHL28</i>	At1g14490	SALK_022937	5' UTR

Tabulka 1: Použité T-DNA inzerční linie

Dále byly použity dříve připravené overexpresní linie dostupné v laboratoři. Konkrétně *p35S::AHL28:GFP* na pozadí Col-0 a na pozadí mutanta *rdr6*, u něhož je vyřazena funkce RNA dependentní RNA polymerázy 6, která je zodpovědná za posttranskripční silencing (Deuschle et al., 2006).

Kultivace rostlinného materiálu

Semena *Arabidopsis* byla po dobu 15 minut sterilizována v 1 ml roztoku chlornanu sodného (20% roztok SAVO a 1% Triton) a následně ve sterilních podmínkách třikrát promyta stejným objemem sterilní vody. Potom byla vernalizována po dobu 3 dnů při 4 °C a až poté byla vysévána na pevné médium či na rašelinové pelety.

Rostliny určené na genotypování, křížení, propagaci semen či transformaci, byly vysévány na rašelinové pelety a dále kultivovány v kultivační místnosti s fotoperiodou 16/8, při zářivkovém osvětlení 100μmol/m²/s, konzistentní vlhkostí 40% a teplotou 23°C.

Pevné médium na pěstování rostlin *in vitro* se standardně skládalo z 0,2 MS ((Murashige, 1962) Murashige and Skoog Basal Salt Mixture, Sigma-Aldrich), 0,8% agaru a 1% sacharózy. Médium bylo sterilizováno v autoklávu (121 °C, 1,3 bar, 20min), následně bylo naléváno ve sterilním boxu do hranatých plastových misek. Plotny se sterilně vyšetými semeny byly umístěny do stojanu pod úhlem 45° a pěstovány v kultivační místnosti s fotoperiodou 16/8, vlhkostí 40%, zářivkovou osvětleností 100μmol/m²/s a teplotou 21°C

Rostliny určené na fenotypové analýzy byly kultivovány na pevném médiu vždy do stejného vývojového stádia, což odpovídalo 7 či 8 dnům po vernalizaci.

Pro experiment s auxinovým gradientem, jsme do standardního média přimíchali auxinový zásobní roztok (Tabulka 2). Rostliny jsme nejprve 3 dny předpěstovali na MS médiu a následně

jsme je přesadili na misky s médiem obsahujícím exogenně dodaný auxin a dále je kultivovali po dobu 4 dní.

koncentrace zás. roztoku NAA	výsledná koncentrace NAA	množství (100 ml)
1mg /ml etanolu	50 nM	0,93 µl
	75 nM	1,39 µl
	100 nM	1,86 µl

Tabulka 2: Složení média s přidaným auxinem

7.2. Extrakce DNA pomocí izopropanolové precipitace

DNA izolovaná pomocí tohoto protokolu je používána jako templát pro genotypování. Protokol byl modifikován podle původního (Edwards et al., 1991). Přibližně z týdenní rostliny pěstované na rašelinové peletě odebereme vysterilizovanými nástroji malý lístek a vložíme ho do 2 ml eppendorfové zkumavky společně s nerezovou mlecí kuličkou a následně zmrazíme v tekutém dusíku. Zmraženou rostlinnou hmotu homogenizujeme při 30 kmitech za sekundu po dobu 30 sekund. K rozdrceným listům přidáme 200 µl extrakčního pufru (složením: 200 mM Tris HCl 20 ml, 250 mM NaCl 5 ml, 25 mM EDTA 5 ml, 0,5% SDS 5 ml - následně doplněno do 100 ml H₂O). Směs vortexujeme po dobu 10 sekund, vyjmeme nerezovou kuličku a zkumavku stočíme 2 minuty v centrifuze při 14000rpm. Supernatant přeneseme do čisté zkumavky a přidáme k němu stejné množství izopropanolu, přibližně 175 µl. Promícháme a necháme je stát při laboratorní teplotě 2 minuty. Centrifugujeme 4 minuty při 14000rpm. Čistou špičkou odstraníme supernatant. Vytvořenou peletu promyjeme 1 ml 70% ethanolu a centrifugujeme 5 minut při maximálních otáčkách. Posléze odsajeme tekutinu ze zkumavky a necháme vytvořenou peletu několik minut vysušit. Po odpaření ethanolu přidáváme k peletě 5 µl sterilního 10xTE pufru (složením: 1M Tris 1ml, 0,5M EDTA 0,2 ml - následně doplněno do 100 ml H₂O) a 45 µl sterilní H₂O.

7.3. Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce byla využita pro ověření přítomnosti nebo absence inzercí T-DNA ve zkoumaných mutantních rostlinách a pro izolaci jednotlivých částí genu. Příklad používaného programu je uveden v Tabulce 3. Nasedací teplota primerů byla vypočítána podle internetové kalkulačky na stránkách výrobce (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>). Výběr typu polymerázového enzymu záleží na využití PCR produktu. Při izolaci částí genu našeho zájmu použijeme enzym s proofreadingovou aktivitou, což je v našem případě Q5 polymeráza (Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, NEB). V ostatních případech například genotypování jsme využili DreamTaq polymerázu (Thermo Scientific).

Potřebný premix se liší v závislosti na použitém enzymu a stejně tak se liší výsledné objemy reakcí. Při izolaci PCR namožených genových fragmentů enzymem Q5 pracujeme s objemem 50 μl a u genotypovací PCR s DreamTaq polymerázou je dostačující objem 20 μl . Složení premixu naleznete v Tabulce 4.

polymeráza	DreamTaq		Q5	
fáze cyklu	teplota	čas (min)	teplota	čas (min)
iniciální denaturace	94 °C	2:00	94 °C	2:00
denaturace	94 °C	0:30	94 °C	0:30
nasedání primerů	specifické Tm	1:00	specifické Tm	1:00
syntéza	72 °C	1:00/ 1000bp	72 °C	30s/ 1000bp
terminální syntéza	72 °C	10:00	72 °C	10:00
ochlazení	4 °C	∞	4 °C	∞

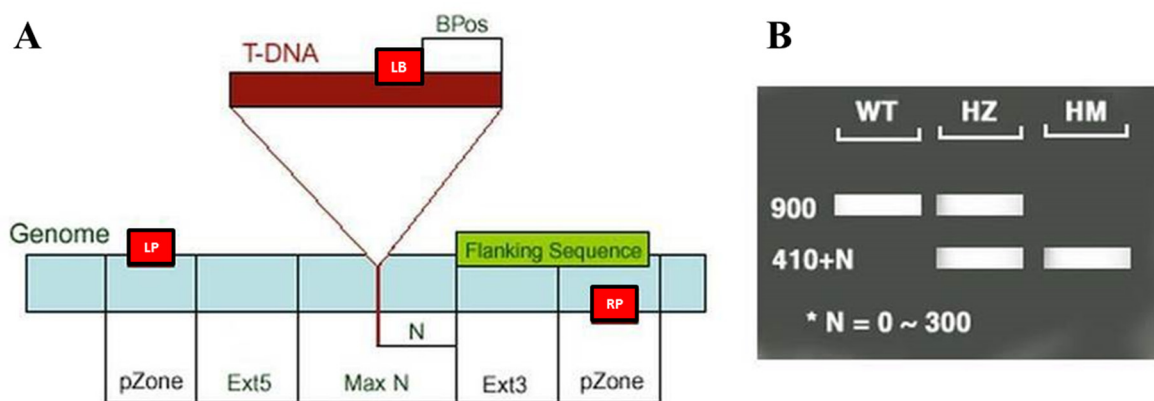
25x

Tabulka 3: Program PCR

polymeráza	DreamTaq		Q5	
chemikálie	koncentrace	objem (20 μl)	koncentrace	objem (50 μl)
DNA	-	1 μl	-	1 μl
polymeráza	5 U/ μl	0,04 μl	2 U/ μl	0,5 μl
pufr	10x konc	2 μl	5x konc	10 μl
primer Fv	20 μM	0,5 μl	10 μM	2,5 μl
primer Rv	20 μM	0,5 μl	10 μM	2,5 μl
dNTP	10 mM	0,4 μl	10mM	1 μl
dH ₂ O	-	15,56 μl	-	32,5 μl

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR

Ověření přítomnosti T-DNA inserce zjišťujeme pomocí PCR s rozdílnou dvojicí primerů. V jedné směsi bude kombinace LP a RP primerů, které jsou nadesignované na začátek a konec cílového genu a ve druhé kombinace LB a RP, kde LB cílí do vložené T-DNA. Protokol byl převzat z Signal.salk.edu. Přítomnost rozdílně dlouhých produktů určí, zda jsou homozygotní, heterozygotní nebo nemají T inserci. (Obrázek 3, Tabulka 5).



Obrázek 3: Princip genotypování. (A) Znárodnění umístění jednotlivých primerů použitých do PCR reakce.(B) Výsledek genotypování se znárodněnými jednotlivými variantami kde délka a počet bandů ukazuje původní genotyp (WT), heterozygotního (HZ) nebo homozygotního (HM) jedince. Převzato a upraveno z signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html.

linie	mutovaný gen	typ primeru	sekvence
SAIL_646_A02	<i>AHL28</i>	LP	CACAAATTTCAAAGGCTCACG
SAIL_646_A02	<i>AHL28</i>	RP	TTCCGTGGAAAGTAATGGTTG
SALK_022937	<i>AHL28</i>	LP	AGTTTCTTTGCTCTTCCTCCG
SALK_022937	<i>AHL28</i>	RP	GTCACCACTGCTTACGAAAGC
SAIL	-	LB3	TAGCATCTGAATTCATAACCA
SALK	-	LBb 3.1	ATTTTGCCGATTTCGGAAC

Tabulka 5: Genotypovací primery

7.4. Gelová agarózová elektroforéza

Agarózový gel namícháme podle předpisu v Tabulce 6, a následně ho nalejeme do formy s hřebeny, jež vytvoří v gelu jamky. Po ztuhnutí vložíme gel do elektroforézní vany, která je naplněna 0,5x TAE pufrem (složením: 10 ml 50x TAE, doplnit do 1 l dH₂O). Do jednotlivých jamek nanášíme PCR produkt smíchaný s nanášecím barvivem (6X DNA Loading Dye, Thermo Scientific) v poměru 5:1 a jako srovnávací standard pro určení délky fragmentu nanese do poslední jamky GeneRuler o velikosti buď 1 kb či 100bp Plus (Thermo Scientific). Napětí zdroje bylo nastaveno v rozmezí od 70-160 V v závislosti na velikosti elektroforézní vany.

agarózový gel			50x TAE		
chemikálie	koncentrace	množství (500ml)	chemikálie	finální koncentrace	množství (500ml)
agaróza	0,1%	5 g	TRIS base	2 M	121 g
0,5x TAE	-	500 ml	kyselina octová	1 M	28,5 ml
Gel Red™	0,01%	50 µl	EDTA	50 mM	50 ml z 0,5 M zásobního roztoku
			dH ₂ O	-	421,5 ml

Tabulka 6: Složení agarózového gelu a TAE pufru

7.5. Křížení

Rostliny určené ke křížení pěstujeme na rašelinových peletách přibližně 3 týdny do fáze, kdy mají několik květních stvolů. Mateřské rostliny zbavíme šesulí, květů a všech poupat, které mají viditelný pestík. Pro vizualizaci používáme na detailní práce binokulární lupu (Olympus SZX7). Ostrou pinzetou vytrhneme nezralý květní meristém, takže na stvolu zůstane jen cca 5 nezralých poupat. Poupatům odklopíme jeden okvětní plátek, čímž si vytvoříme přístup k nezralým tyčinkám, které vytrháme. Připravené rostliny přivážeme ke špejli a vrátíme je zpět do kultivační místnosti na další dva dny. Po uplynutí dvou dnů vezmeme zralé květy otcovské rostliny a jejich pyl přeneseme na připravené blizny mateřských rostlin. Opylené rostliny popíšeme a vrátíme zpět do kultivační místnosti, kde je necháme plně dozrát. Šesule následně sklídíme, čímž získáme uniformní F1 generaci, kterou přepěstujeme do F2 generace, která má štěpný poměr (9:3:3:1). Dále pracujeme již s F2 generací a genotypováním ověřujeme přítomnost požadovaných genů. Námi provedená křížení viz Tabulka 7.

mateřská rostlina	otcovská rostlina
<i>ahl28</i>	<i>DR5::GUS</i> (Col)
<i>p35S::AHL28:GFP</i> (Col)	<i>DR5::GUS</i> (Col)
<i>p35S::AHL28:GFP (rdr6)</i>	<i>DR5::GUS</i> (Col)

Tabulka 7: Linie použité na křížení

7.6. GUS detekce

Vizualizace enzymu β -glukuronidázy, je založena na přeměně substrátu X-gluc na sraženinu modrého zbarvení. Použijeme 7 až 10 denní *in vitro* rostliny pěstované (viz Kapitola 7.1). Vezmeme šestijamkové plastové destičky vychlazené na ledu a do každé jamky připipetujeme 3 ml 90% acetonu vychlazeného na -20°C. Do každé jamky vložíme rostlinu, kterou fixujeme po dobu 30 minut při -20°C v mrazáku. Následně dvakrát promyjeme 2 ml vychlazeného

promývacího pufru (Tabulka 8) a ten necháme 15 minut působit při pokojové teplotě. Dále rostliny odvzdušňujeme v exsikátoru nejméně po dobu jedné hodiny, dokud nepřestanou unikat vzduchové bublinky. Po odvzdušnění odsajeme promývací pufr a nahradíme ho barvicím roztokem (Tabulka 8). Destičky vložíme do vodní lázně, která je temperovaná na 37°C a barvíme přes noc. Druhý den zkontrolujeme přítomnost modrého zbarvení pod binokulární lupou a následně rostliny promýváme glycerolovou řadou. Nejprve odsajeme barvicí roztok a nahradíme ho 2 ml 15% glycerolu s 2% dimethylsulfoxidem (DMSO) a necháme 30 minut působit. Stejně parametry poté opakujeme s 30 % glycerolem s 2% DMSO, 50% glycerolem s 0,1% Tritonem až se dostaneme k 65% glycerolu s 2% DMSO. Nabarvené rostliny přemístíme na odmaštěné podložní sklíčko se dvěma tenkými proužky parafilmu po krajích, které zabrání rozmáčknutí preparátu, a 90 µl projasňovacího roztoku (Tabulka 9). Připravené preparáty necháme přes noc v lednici projasnit při 4°C.

chemikálie		zásobní koncentrace	finální koncentrace	množství na 50 ml	
promývací pufr	barvicí pufr	promývací/barvicí pufr		promývací pufr	barvicí pufr
ferrokyanid		50 mM	0,5 mM	0,5 ml	0,5 ml
ferrikyanid		50 mM	0,5 mM	0,5 ml	0,5 ml
NaPO ₄ pufr, pH 7		100 mM	100 mM	49 ml	48,375 ml
-	X-Gluc (v DMSO)	20 mg/ml (jen barvicí pufr)	0,25 mg/ml (jen barvicí pufr)	-	0,625 ml

Tabulka 8: Složení roztoků pro GUS barvení

projasňovací roztok		
chemikálie	koncentrace	množství na 20 ml
65 % glycerol	-	20 ml
Na ₂ S ₂ O ₃	0,008 %	0,04 g
NaI	3,4 %	17 g
DMSO	2 %	0,4 ml

Tabulka 9: Složení projasňovacího roztoku

7.7. Kvantitativní zhodnocení makroskopické struktury kořenového systému

Rostliny, které byly napěstovány na agarovém mediu za účelem fenotypové analýzy, byly naskenovány při vysokém rozlišení a kvalitě (1200 dpi, 48 bitové barvy) pomocí skeneru Epson V800 Photo. Následně byly pořízené obrázky upraveny a převedeny na 8 bitové stupně šedi a analyzovány v programu ImageJ, pomocí jeho volně dostupného pluginu SmartRoot (Lobet et al., 2017).

7.8. Statistické vyhodnocení výsledků

Pro statistické zpracování dat byl využit program NCSS 9 Statistical Software ((2013) NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA, ncss.com/software/ncss.) Vyhodnocení fenotypové analýzy byla prováděna pomocí GLM a One- way ANOVA testu a parametry byly zároveň porovnány

Tukey-Kramer Multiple Comparison testem. Makroskopické pozorování bylo provedeno ve třech nezávislých kultivacích. Mikroskopická analýza byla opakována dvakrát, stejně tak jako experiment s exogenně přidaným auxinem. Celkový počet rostlin jedné linie ze všech opakování je uveden v jednotlivých grafech.

7.9. Barvení rostlin propidium jodidem

V rámci lepší vizualizace a hlavně orientace v jednotlivých pletivech kořene, byly rostliny nabarveny fluorescenčním barvivem propidium jodid, která se v živých buňkách váže na buněčné stěny a tím je vyznačí. Na barvení byly použity 9 denní rostliny, které rostly na pevném MS médiu.

Při detekci signálu v živých rostlinách jsme buněčné stěny barvili v roztoku složeného z 1 ml H₂O a 25 µl zásobního roztoku (složení: 1 mg/ml propidium jodid). Barvení probíhalo přibližně 5 minut a po uplynutí intervalu jsme preparát přenesli na sklíčko se dvěma tenkými pásy parafilmu do kapky vody, přiklopili krycím sklíčkem a mikroskopovali na konfokálním mikroskopu (Zeiss LSM 880).

Na barvení fixovaných rostlin jsme modifikovali protokol podle (Dubreucq et al., 2008). Fixáž (složení: 50% metanolu, 20% kyseliny octové a doplněno dH₂O) jsme vychladili na -20 °C. Rostliny jsme přenesly do malé Petriho misky, kam jsme připipetovali 3 ml fixáže. Takto jsme nechali rostliny ve 4 °C po dobu 5 hodin fixovat. Následně jsme roztok odsáli kapátkem a rostliny 3x promyli stejným objemem dH₂O. Poté jsme vodu nahradili 0,2% roztokem kyseliny jodisté, kterou jsme nechali působit 40 minut a následně jsme zopakovali promývací krok s dH₂O. Nakonec jsme připravili roztok s propidium jodidem (Tabulka 10), do kterého jsme rostliny umístili, a nechali je nejméně hodinu barvit. Připravené preparáty jsme montovali do projasňovacího roztoku (viz Kapitola 7.6), a následně mikroskopovali.

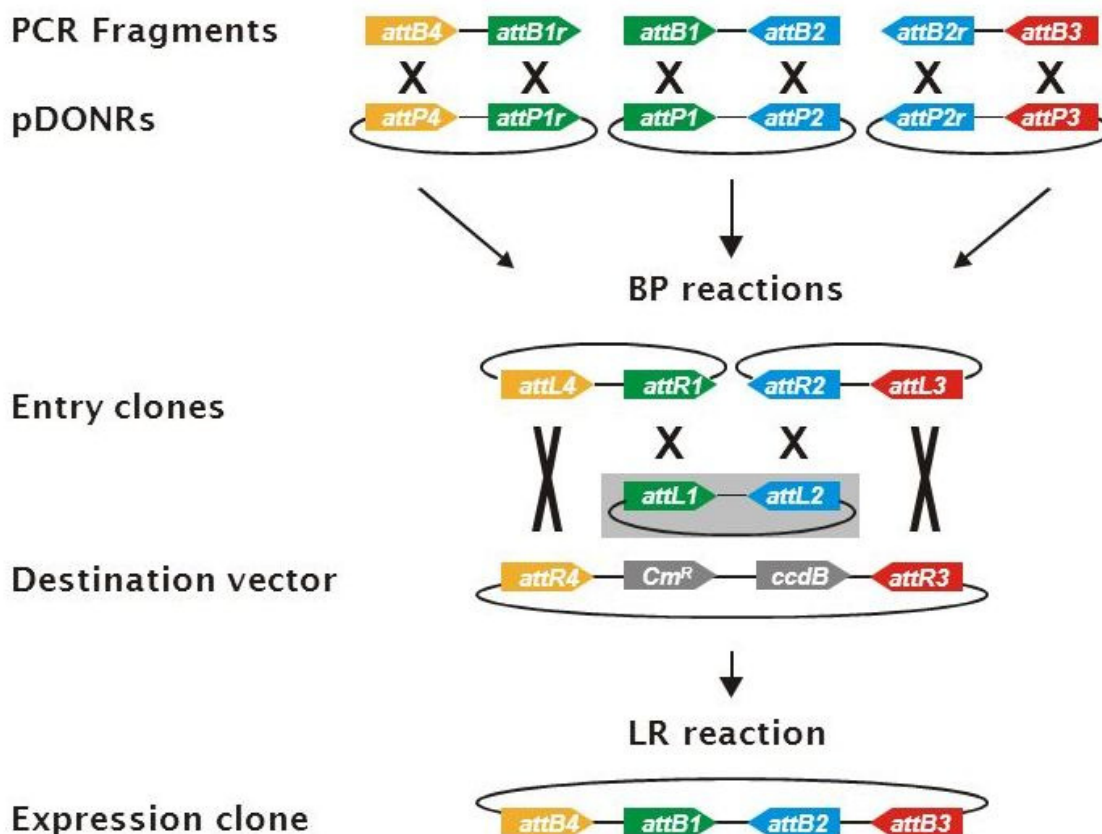
chemikálie	koncentrace	množství (10 ml)
disiřičitan sodný	100nM	0,19 g
HCl	0,15M	146 µl
propidium jodid	1 mg/ml	100 µl
dH ₂ O	-	9,75 ml

Tabulka 10: Složení roztoku na barvení propidium jodidem

7.10. Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana*

Pro vytvoření transkripční a translační fúze pro *AHL28* byl využit klonovací systém Multisite Gateway®. Ten umožňuje tvorbu plazmidů z několika fragmentů DNA na základě přítomnosti specifických rekombinačních míst. Základem této techniky jsou dvě reakce BP a LR, kdy při

první dojde k vložení námi vybrané sekvence do vstupního vektoru, který je následně použit společně s dalšími plazmidy do LR reakce, kde dojde díky rekombinačním sekvencím k poskládání jednotlivých fragmentů do destinačního vektoru (Obrázek 4).



Obrázek 4: Schéma Multisite Gateway® systému pro složení tří fragmentů se specifickými rekombinačními místy. Převzato z <https://www.thermofisher.com>.

Izolace genu

Pro izolaci jednotlivých částí genu, byla použita standartní PCR, s polymerázou Q5 s proof-readingovou aktivitou (Kapitola 7.3). Genomová DNA, jež je použita jako templát byla vyizolována metodou CTAB podle modifikovaného protokolu (Murray and Thompson, 1980). Typ a sekvence primerů použitých na jednotlivá izolování jsou uvedeny v Tabulce 11. PCR produkt a jeho predikovaná délka byly ověřeny pomocí gelové elektroforézy (Kapitola 7.4). Produkt požadované velikosti, byl vyříznut z gelu a purifikace produktu probíhala pomocí kitu (High Pure PCR Cleanup Micro Kit, Roche)

BP reakce

Vyizolované fragmenty DNA byly následně zaklonovány do vstupních vektorů (Tabulka 11). Reakce se skládala z 0,5 µl amplifikované DNA, vektoru, jehož objem byl dopočítán tak, aby jeho koncentrace v reakci byla nejméně 150 ng/µl a 1 µl BP klonázy (Gateway® BP Clonase® II enzyme mix, ThermoFischer Scientific). Výsledný objem reakce měl být 5 µl, takže pokud to bylo nutné, byla přidána do požadovaného množství destilovaná voda. Připravená směs byla ponechána přes noc v laboratorní teplotě. Následující den byl do reakce přidán 1 µl proteinázy K a vzorek byl umístěn na 15 minut do 37 °C, čímž došlo k zastavení reakce.

BP reakce						
izolovaný úsek	izolační primery		attB místa	vstupní vektor	výsledný vektor	rezistence
promotor AHL28	forward	<u>GGGGACA</u> ACTTTGTAT AGAAAAAGTTGCTGATC AGAAAAACTCTGAA	attB4	pDONR P1P4R	pEN-L4-pAHL28-R1	kanamycin
	reverse	GGGGACTGCTTTTTG <u>TACAAACTG</u> CCAAGT GTCGCTGTGTAGG	attB1R			
kódující sekvence AHL28	forward	<u>GGGGACA</u> AGTTTGTAC AAAAAAGCAGGCTTAA TGGAACCGTCGGGCGTC	attB1	pDONR P1P2	pEN-L1-AHL28-CDS-L2	kanamycin
	reverse	GGGGACCACTTTGTAC <u>AAGAAAGCT</u> GGGTAAGT ACGGCGATGGAGCTTTGGC	attB2			

Tabulka 11: Sekvence izolačních primerů (podtržené att sekvence) a vektory účastníci se BP reakce a jejich rezistence

Práce s *Escherichia coli*

Produkt BP reakce následně vnášíme pomocí elektroporace do kompetentních buněk *Escherichia coli* (DH5a), které byly připraveny podle standardního protokolu (Ansel et al., 1987). Na ledu připipetujeme 2 µl produktu BP reakce k 50 µl elektrokompetentních bakteriálních buněk, lehce zamícháme a počkáme cca 1 minutu. Následně obsah zkumavky přeneseme pipetou do vychlazené elektroporační kyvety a tu vložíme do elektroporátoru (Eporator electroporator, Eppendorf). Při napětí 2500 V a po dobu 4 až 6 ms byly plazmidy elektroporovány do bakterií. Obsah kyvety propláchneme 1 ml SOC 1 média (Tabulka 12) a výsledný roztok přeléváme do sterilních zkumavek, které umístíme na hodinu do 37 °C, kde je necháme nakloněné třepat. Po plynutí intervalu vezmeme připravené bakterie a opatrně je stočíme (2 minuty, 5000 rpm), čímž vznikne peleta, kterou sterilně resuspendujeme ve 100 µl SOC 1 média a tuto suspenzi rozetřeme na tuhé LB médium s příslušnou antibiotikovou selekcí (Tabulka 17, Tabulka 16).

Plotny s LB médiem jsou dále kultivovány po dobu cca 15 hodin ve 37 °C.

chemikálie	pepton	kvasničný extrakt	glukóza	NaCl	KCl	MgCl ₂	MgSO ₄
množství (50 ml)	1g	0,25 g	0,18 g	0,03 g	0,009 g	0,10 g	0,12 g

Tabulka 12: Složení SOC média

chemikálie	pepton	kvasničný extrakt	NaCl	agar	dH ₂ O
tuhé LB médium	10 g/l	10 g/l	10 g/l	15 g/l	požadovaný objem
tekuté LB médium	10 g/l	10 g/l	10 g/l	-	požadovaný objem

Tabulka 173: Složení LB médií

antibiotikum	koncentrace zásobního roztoku	rozpuštěno	finální koncentrace	požadované ředění	objem přidáný na 500ml média
kanamycin	50 mg/ml	H ₂ O	50 mg/l	1000x	500 µl
hygromycin	30 mg/ml	H ₂ O	30 mg/l	1000x	500 µl
spektinomycin	30mg/ml	H ₂ O	30 mg/l	1000x	500 µl
rifampicin	10 mg/ml	metanol	10mg/l	100x	50µl
basta	15 mg/ml	H ₂ O	15 mg/l	1000x	500 µl
gentamycin	50 mg/ml	H ₂ O	50 mg/l	1000x	500 µl
claforan (cefotaxim)	100 mg/ml	H ₂ O	100 mg/l	300x	1500 µl

Tabulka 14: Koncentrace použitých antibiotik

Genotypování bakteriálních kolonií

Po nárůstu bakteriálních kolonií na selekčních plotnách ověříme přítomnost požadovaných plazmidů v jednotlivých koloniích. Nejprve si vybereme několik kolonií, které si poznačíme a následně sterilně přeneseme malé množství jejich buněčné masy do malých 0,2 ml eppendorfových zkumavek na PCR. PCR premix je stejný, jako je uvedeno v Kapitole 7.3 použijeme DreamTaq polymerázu a v našem případě za primery volíme primery M13 (Tabulka 15), jež mají specifická vazebná místa na námi zvoleném vstupním vektoru. Výsledek je dále vizualizován gelovou elektroforézou. Kolonie obsahující požadovaný vektor sterilně zaočkujeme do 3 ml tekutého LB média (Tabulka 13) s přidáním selekčním antibiotikem (Tabulka 11, 14, 16), kde je necháme přes noc ve 37 °C namnožit za stálého třepání.

Při úspěšném namnožení se LB médium zakalí a je možné z něj izolovat plazmid pomocí kitu (ZR Plasmid MiniPrep Classic, Zymo Research). Správnost izolátu ještě následně ověříme pomocí sekvenace s M13 primery (Biogen Praha – GATC, Eurofins Genomics).

M13 Fw	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 Rv	CAGGAAACAGCTATGAC

Tabulka 15: Sekvence primerů M13

LR reakce

Reakce probíhá v celkovém objemu 5 μ l. Vstupní vektory připipetujeme v objemu, aby jejich výsledná koncentrace byla alespoň 150 ng/ μ l a to samé platí pro destinační vektor (Tabulka 16). Dále přidáme 1 μ l LR klonázy (Gateway® LR Clonase® II enzyme, ThermoFischer Scientific) a popřípadě doplníme destilovanou vodou. Reakci necháme běžet přes noc v pokojové teplotě a druhý den ji ukončíme přidáním 1 μ l proteinázy K a patnácti minutovým zahřátím na 37 °C.

Produkt LR reakce elektroporujeme do bakteriálních buněk *Escherichia coli* a výsledný plazmid namnožíme (viz Práce s *Escherichia coli* a Genotypování bakteriálních kolonií).

LR reakce						
výsledný konstrukt	vstupní vektory			destinační vektor	rezistence	
					bakt.	rosl.
<i>pAHL28:: GUS</i>	pEN-L4-pAHL28-R1			pGWB633	spekt	basta
<i>pAHL28::GFP:GFP</i>	pEN-L4-pAHL28-R1	pEN-L1-NF-L2	pEN-R2-F-L3	pK7m34GW	spekt	kan
<i>pAHL28::AHL28:mCherry</i>	pEN-L4-pAHL28-R1	pEN-L1-AHL28-CDS-L2	pEN R2-R-L3	pH7m34GW	spekt	hyg

Tabulka 16: Vektory použité v LR reakci a jejich rezistence

Práce s *Agrobacterium tumefaciens*

K transformaci rostlin využíváme *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101). Nejprve elektroporujeme plazmid do bakterií. Do 50 μ l bakteriálního stocku přidáme 2 μ l vektoru vzniklého z LR reakce a necháme 2 minuty odstát na ledu. Dále přeneseme obsah zkumavky do vychlazené kyvety a elektroporujeme při napětí 2000V. Bezprostředně poté přidáme do kyvety 1 ml Yeb Recovery média (Tabulka 17), směs přelijeme do sterilní zkumavky, kterou umístíme na 2 hodiny do 28 °C na třepačku. Posléze vysejeme suspenzi na LB plotnu s kombinací antibiotik rifampicin a gentamycin, a také se specifickým selekčním antibiotikem pro náš vektor (koncentrace Tabulka 14). Na plotnách se nechají bakterie kultivovat ve 28 °C přibližně 2 dny. Po nárůstu bakterií ověříme přítomnost plazmidu pomocí PCR (viz Genotypování bakteriálních kolonií) a pozitivní kolonie přeneseme do 3 ml tekutého LB média

se stejnou kombinací antibiotik jako předtím a ponecháme je množit po dobu 2 dní ve 28°C. Následně připravíme bakteriální konzervu (složením: 400 µl inokulátu, 100 µl sterilního 50% glycerolu, smíchat a okamžitě zamrazit v tekutém dusíku, následně skladovat při -80°C) a zbytek suspenze přelijeme do 50 ml tekutého LB média s antibiotiky a necháme kultivovat po stejnou dobu a stejný čas jako v přechozích dvou případech.

chemikálie	pepton	kvasničný extrakt	sacharóza	NaCl	KCl	MgCl ₂	MgSO ₄
množství (100 ml)	1 g	0,1 g	0,5 g	0,06 g	0,02 g	0,1 g	0,05 g

Tabulka 17: Složení Yeb Recovery média

Transformace rostlin metodou floral dip

Po inokulaci a nárůstu centrifugujeme suspenzi *Agrobacterium* po dobu 20 minut při 5000g. Následně peletu resuspendujeme v infiltračním médiu, skládajícím se z 5% sacharózy a 0,05% Silwetu.

Velkou Petriho misku vyložíme mikrotenovým sáčkem a do něj nalijeme namíchaný roztok. Pro transformaci jsme zvolili dva typy rostlin *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Col-0 a mutanta *rdr6*. Jednotlivé rostliny napěstované na peletách s plně vyvinutými květy a zbavené všech nezralých šesulí, postupně několik vteřin máčíme v suspenzi a následně vložíme celou nadzemní část do čistého igelitového sáčku. Rostliny umístíme do tmy a necháme je přes noc růst. Druhý den sundáme sáčky a přeneseme rostliny do kultivační místnosti, kde je necháme dozrát. Sklizená semena sterilizujeme plynným chlórem, v eppendorf zkumavkách, které umístíme otevřené do stojánku nad kádinku s 50 ml SAVA v exsikátoru, a následně do ní připipetujeme 2 ml koncentrované HCl a exsikátor uzavřeme. Sterilizace probíhá po dobu 4 až 8 hodin dle množství semen ve zkumavce. Zkumavky potom přesuneme do flow-boxu a necháme otevřené vyvětrat od zbytkového chlóru. Semena vyséváme na sterilní plotny s antibiotikem podle zvolené rezistence. Složení média je standardní, pouze před naléváním necháme roztok zchladnout na cca 60°C a přidáme antibiotikum v požadované koncentraci (Tabulka). K selekčnímu antibiotiku přidáváme i claforan, pro utlumení růstu nedokonale vysterilizovaných reziduí *Agrobacterium tumefaciens*.

7.11. Mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie probíhala na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 880 nebo na mikroskopu Zeiss Axio Observer.7 s konfokální jednotkou rotujícího disku Yokogawa CSU-W1-T2 s VS-HOM1000 a homogenizátorem excitačního osvětlení doplněný Back-Illuminated

Scientific CMOS kamerou Photometrics PRIME-95B. Pro vizualizaci jednotlivých fluoroforů byly použity parametry uvedené v Tabulce 18.

fluorofor	laser	excitace	emise
<i>GFP</i>	laser 488 nm	488 nm	515 nm
<i>mCherry</i>	laser 515 nm	561 nm	590 nm

Tabulka 18: Parametry mikroskopování fluoroforů

Pro fenotypovou analýzu a lokalizaci GUS zbarvení byl použit Nikon Eclipse-90i s DIC optikou a barevnou kamerou Nikon Ds-Fi3 (Nikon Instruments Inc., 1076 ER Amsterdam, Netherland).

7.12. qPCR

Kvantifikace byla prováděna na 9 denních rostlinách pěstovaných na tuhém MS médiu. Při pokusu byly použity linie uvedené v Tabulce 19.

mutantní linie	kontrola
<i>ahl28</i>	WT
<i>p35::AHL28:GFP</i> (Col)	Col-0
<i>p35::AHL28:GFP</i> (<i>rdr6</i>)	<i>rdr6</i>

Tabulka 19: Použité linie na qPCR

Izolace RNA byla provedena kitem (Monarch Total RNA Miniprep Kit, NEB #T2010) a koncentrace vyizolované RNA byla naměřena na NanoDrop™ 2000C (Thermo Scientific). Vzorky rozředíme na stejnou koncentraci a pomocí TaqMan™ Reverse Transcription Reagents (ThermoFischer Scientific) přepíšeme do cDNA. Zda přepis proběhl, ověříme PCR s primery pro vnitřní standartu, což byl v našem případě aktin a v dalším kroku použijeme specifické primery pro náš gen a provedeme semikvantitativní PCR (Tabulka 20).

Reakce v celkovém objemu 10 µl byly namíchány podle předpisu v Tabulce 21 s použitím SG PCR Master Mix (Generi Biotech). Pro každý vzorek cDNA i negativní kontroly RNA byly vytvořeny tři technická opakování a s mastermixem obsahující specifické primery a primery pro aktin, jež dále potom sloužily jako referenční hodnota pro standartní míru exprese. Samotná qPCR probíhala na LightCycler 480 (Roche, Basel CH-4070, Switzerland) a její výsledky byly dále zpracovány nejdříve pomocí LightCycler 480 software a poté byla jednotlivým vzorkům spočítána PCR úspěšnost a Cq hodnota v softwaru LinRegPCR 2015.3 (Ramakers et al., 2003)

aktin Fw	AGACATCATGGTGTCTATGGTTG
aktin Rv	TCAAGACGGAGGATGGCATGAG
<i>AHL28</i> Fw	ACTTTCCTCCCTCCTCTACCTC
<i>AHL28</i> Rv	ATTGTCCTCCTCTTCCCCTTC

Tabulka 20: Primery použité na qPCR

chemikálie	množství pro 1 vzorek
cDNA/ RNA	1 µl
SG PCR Master Mix	5 µl
primer Fw	0,2 µl
primer Rv	0,2 µl
dH ₂ O	3,6 µl

Tabulka 21: Reakční směs pro qPCR

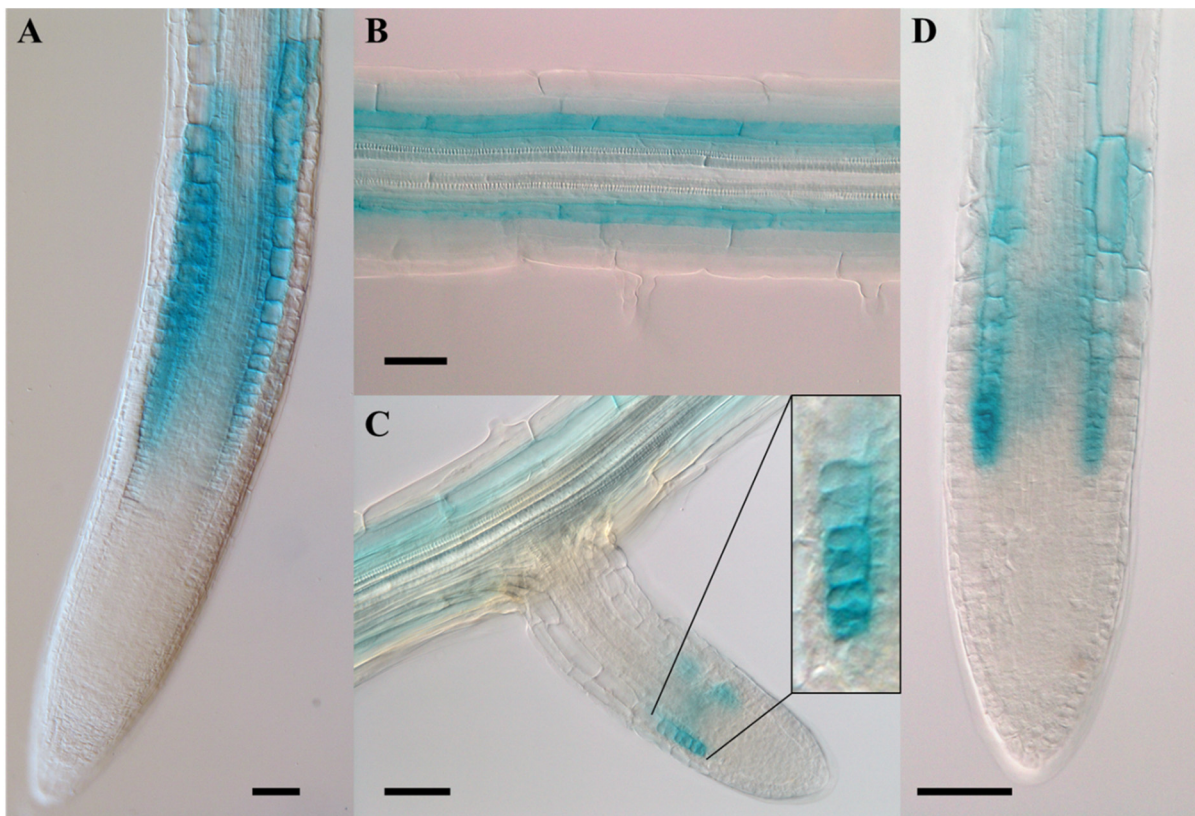
8. Výsledky

8.1. Lokalizace AHL28

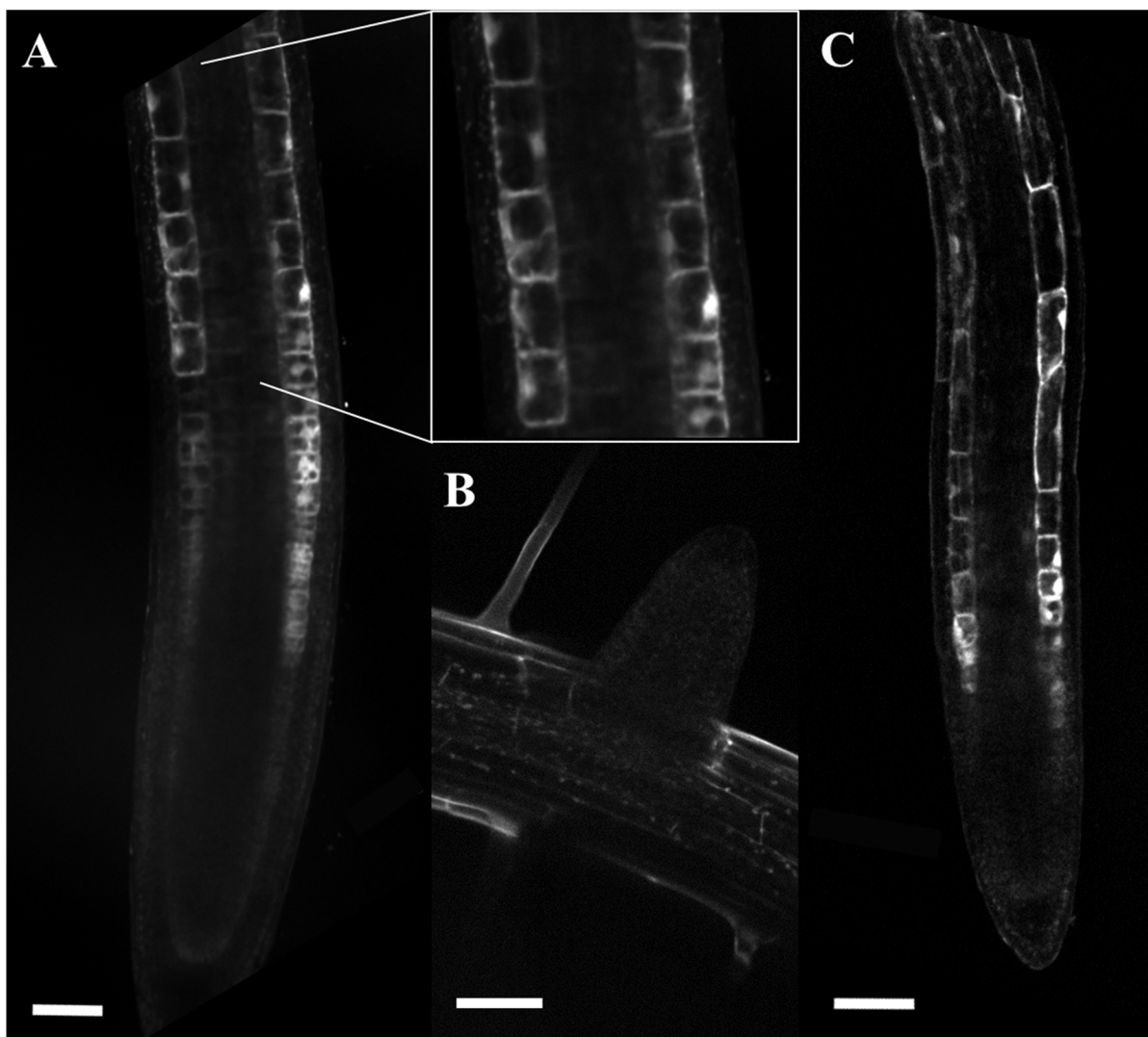
Lokalizace transkripční a translační fúze byla vždy prováděna na pozadí ekotypu Col-0 a mutanta *rdr6*, jak je blíže vysvětleno v metodice.

8.1.1. Lokalizace transkripce

Pro vizualizaci nativního promotoru *AHL28* byly vytvořeny linie s reportérovým genem kódující enzym glukuronidázu GUS (*pAHL28::GUS*) a GFP (*pAHL28::GFP::GFP*). V obou případech byl signál lokalizován především v kořenovém systému, pouze u GUS linií byly nabarveny axilární pupeny, ale to pouze slabě. Exprese *AHL28* začíná v bazální části apikálního meristému primárního kořene ve vrstvách primární kůry a dále pokračuje za diferenciační zónu, kde postupně vymizí a nepokračuje v bazálních částech kořene. V přesné lokalizaci na úrovni buněk a pletiv se pak rozdílně značené linie od sebe částečně liší. Při barvení GUS pozorujeme počátek intenzivní exprese v buňkách primární kůry, jež ukončily svoji dělivou aktivitu a vstupují do zóny tranzitní, ve které se signál objeví i v endodermálních buňkách. Se sníženou intenzitou pokračuje zbarvení v endodermis a v některých buňkách primární kůry elongační a diferenciační zóny. Distribuce signálu v primární kůře je nesourodá, patrně souvisí s ohybem kořene během růstu, ale je obtížné vysledovat trend i u různých linií, nejedná se však pravděpodobně o difúzi barevného produktu, ale zbarvení způsobené aktivitou GUS (Obrázek 5). Exprese GFP signálu také probíhá v přechodové zóně, ale pouze v buňkách primární kůry a ve stejné vrstvě pak pokračuje dále kořenem hluboko za diferenciační zónu, ale nikoliv po celé délce primárního kořene. U postranních kořenů se signál objevuje až u starších kořenů se specializovanou meristematickou a elongační zónou (Obrázek 6). Rozdíly mezi jednotlivými reportérovými proteiny jsou konzistentní v rámci několika nezávislých linií i na rozdílném genetickém pozadí (Col-0, *rdr6*). Příčinou rozdílu lokalizace u různých reportérových linií může být vyšší citlivost k přítomnosti transkriptu u GUS barvení či stabilitou výsledného proteinu. Zároveň může docházet k difuzi barevného produktu reakce v rámci jednotlivých kořenových pletiv.



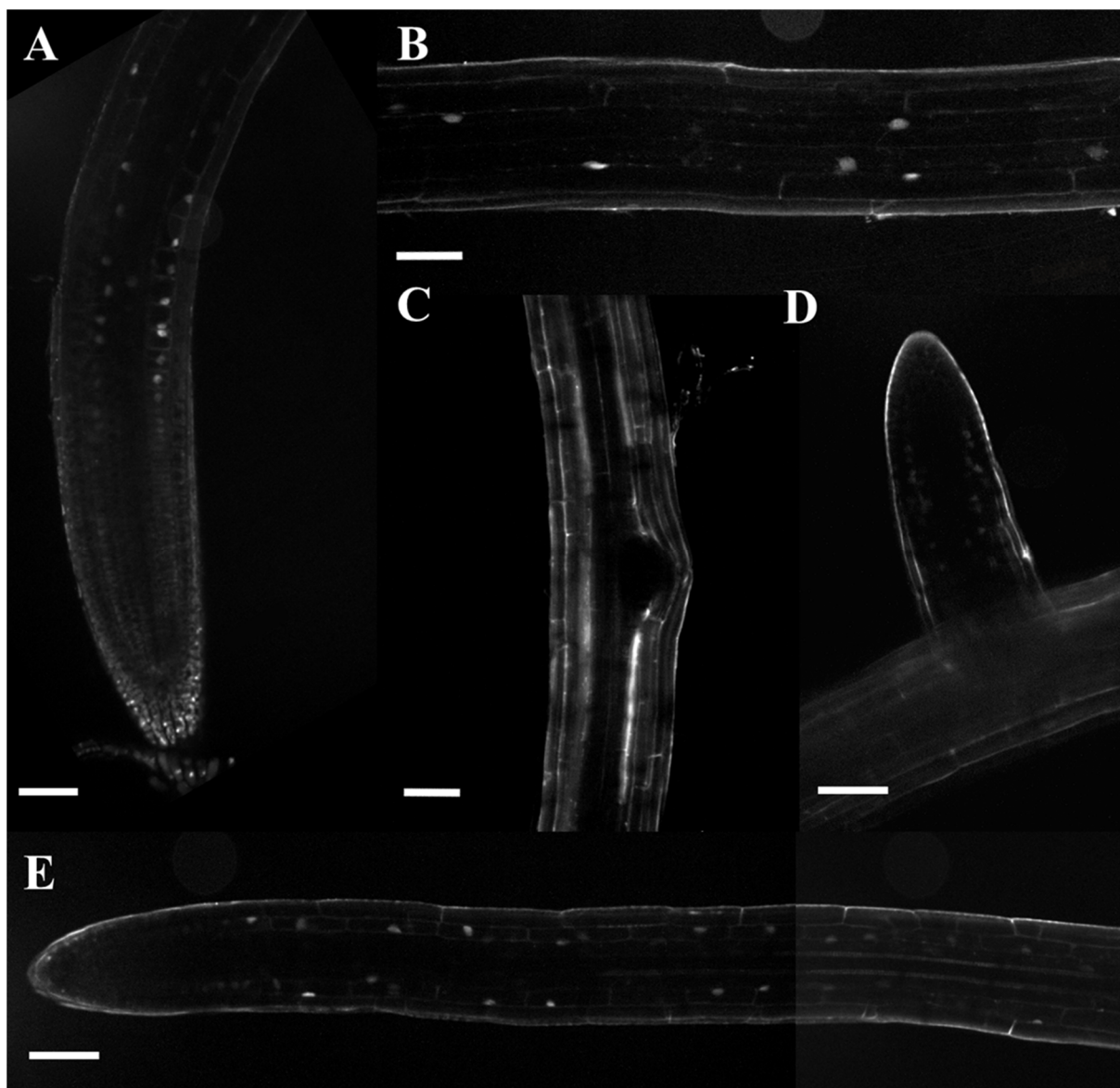
Obrázek 5: Lokalizace aktivity promotoru *AHL28* v linii *pAHL28::GUS* na pozadí Col-0 a *rdr6*. (A) Promotor aktivní v buňkách primární kůry a endodermis přechodové zóny primárního kořene. (B) Diferenciovaný úsek primárního kořene s promotorem aktivním v endodermis. (C) Vývojové stádium postranního kořene expresí promotoru *AHL28* v počínající přechodové zóně v buňkách primární kůry. (D) Plně vyvinutí boční kořen se signálem lokalizovaným do přechodové a elongační zóny v buňkách primární kůry a endodermis. Měřítka je rovno 50 μ m.



Obrázek 6: Promotor *AHL28* vizualizovaný v kořenovém systému linie *pAHL28::GFP::GFP*. (A) Lokalizace GFP signálu promotoru v buňkách primární kůry v hlavním kořeni. (B) Vývojové stádium postranního kořene bez přítomnosti signálu. (C) Vyvinutý boční kořen s promotorovým signálem *AHL28*. Měřítko má velikost 50 μ m.

8.1.2. Lokalizace proteinu

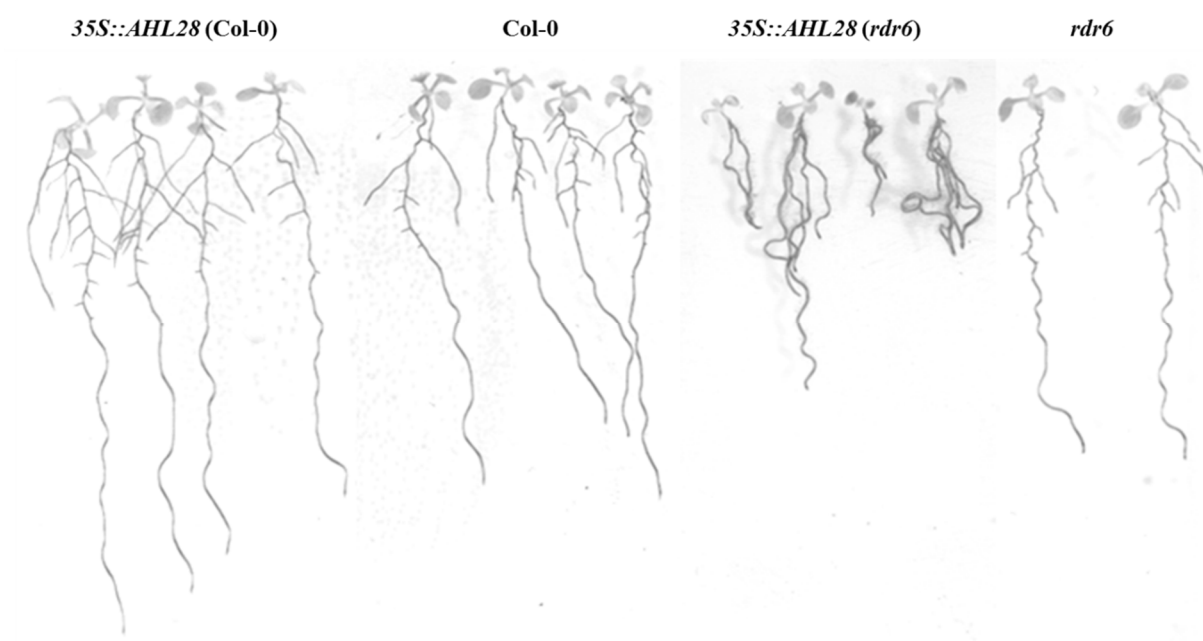
Obdobnou lokalizaci jako transkripční fúze s GFP má i protein AHL28, k němuž byla vytvořena translační fúze s mCherry reportérem (*pAHL28::AHL28:mCherry*). Protein má výhradně jadernou lokalizaci, která byla nejvýrazněji detekována v přechodové zóně primárního kořene v buňkách primární kůry (Obrázek 7). Dále pak signál pokračoval až za diferenciací zónu, kde se postupně vytratil. U postranních kořenů se signál objevuje až po vynoření a ustanovení meristematické, elongační a diferenciací zóny na stejném místě jako v primárním kořeni. V nadzemní části nebyl protein AHL28 pozorován.



Obrázek 7: Lokalizace proteinu AHL28 v kořenovém systému. (A) Přítomnost proteinu v primárním kořeni v buňkách primární kůry. (B) Diferenciovaná část primárního kořene a protein AHL28 přítomný v primární kůře. (C) Kořenové primordium bez přítomnosti signálu. (D) Pozdější vývojové stádium postranního kořene se lokalizací proteinu v počínající tranzientní zóně. (E) Plně vyvinutý boční kořen s viditelným signálem proteinu v primární kůře. Měřítka je rovno 50μm.

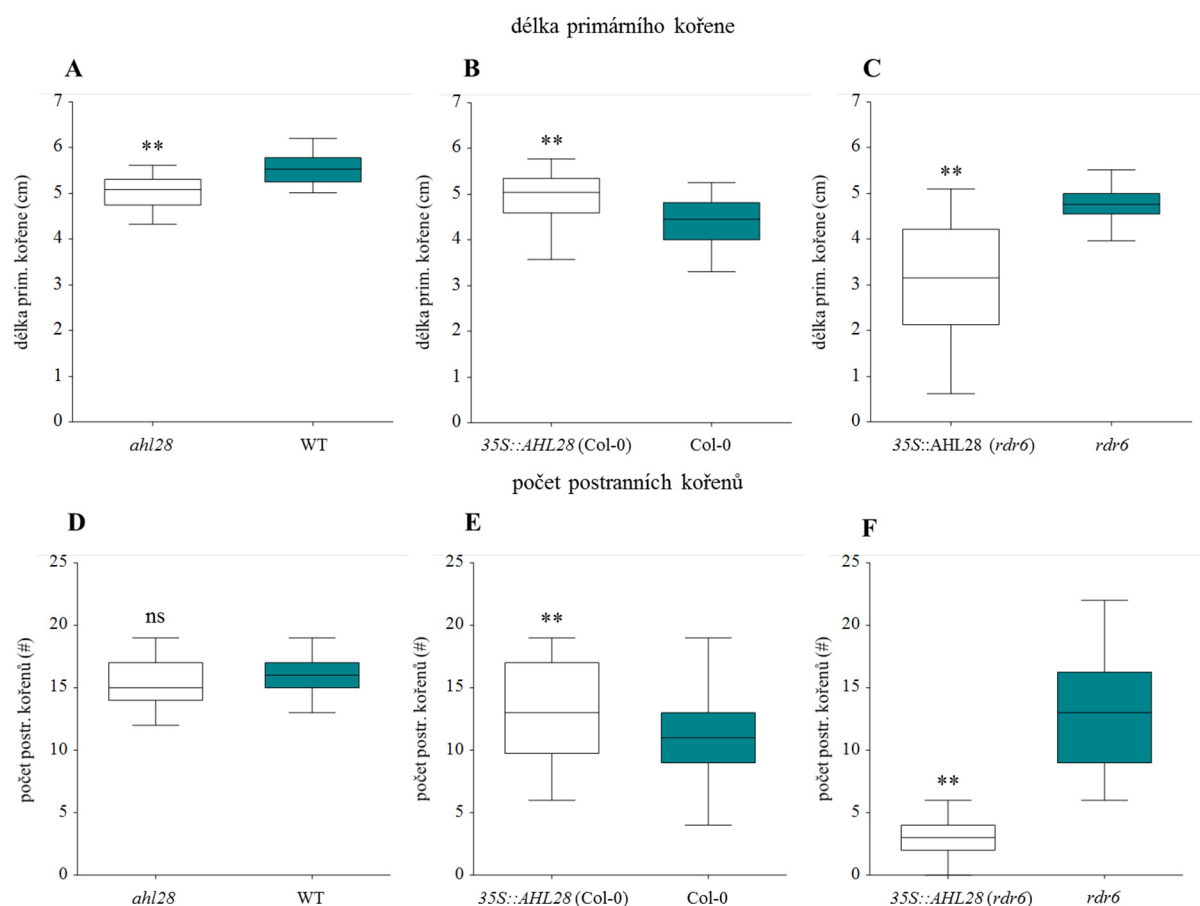
8.2. Vliv modulace exprese *AHL28* na kořenový systém

Fenotypová analýza byla prováděna na třech různých liniích s rozdílnou úrovní exprese *AHL28* a k nim byla vždy přiřazena patřičná kontrola. Porovnávali jsme námi vyselektovaného inzerčního mutantu *ahl28* a dvě overexpresní linie *35S::AHL28:GFP* na pozadí Col-0 a *rdr6* (Obrázek 8). Kultivace rostlin pro potřeby experimentu je uvedena v Kapitole 7.1. Statistické metody jsou uvedeny v Kapitole 7.8 a zároveň v popisku jednotlivých grafů.



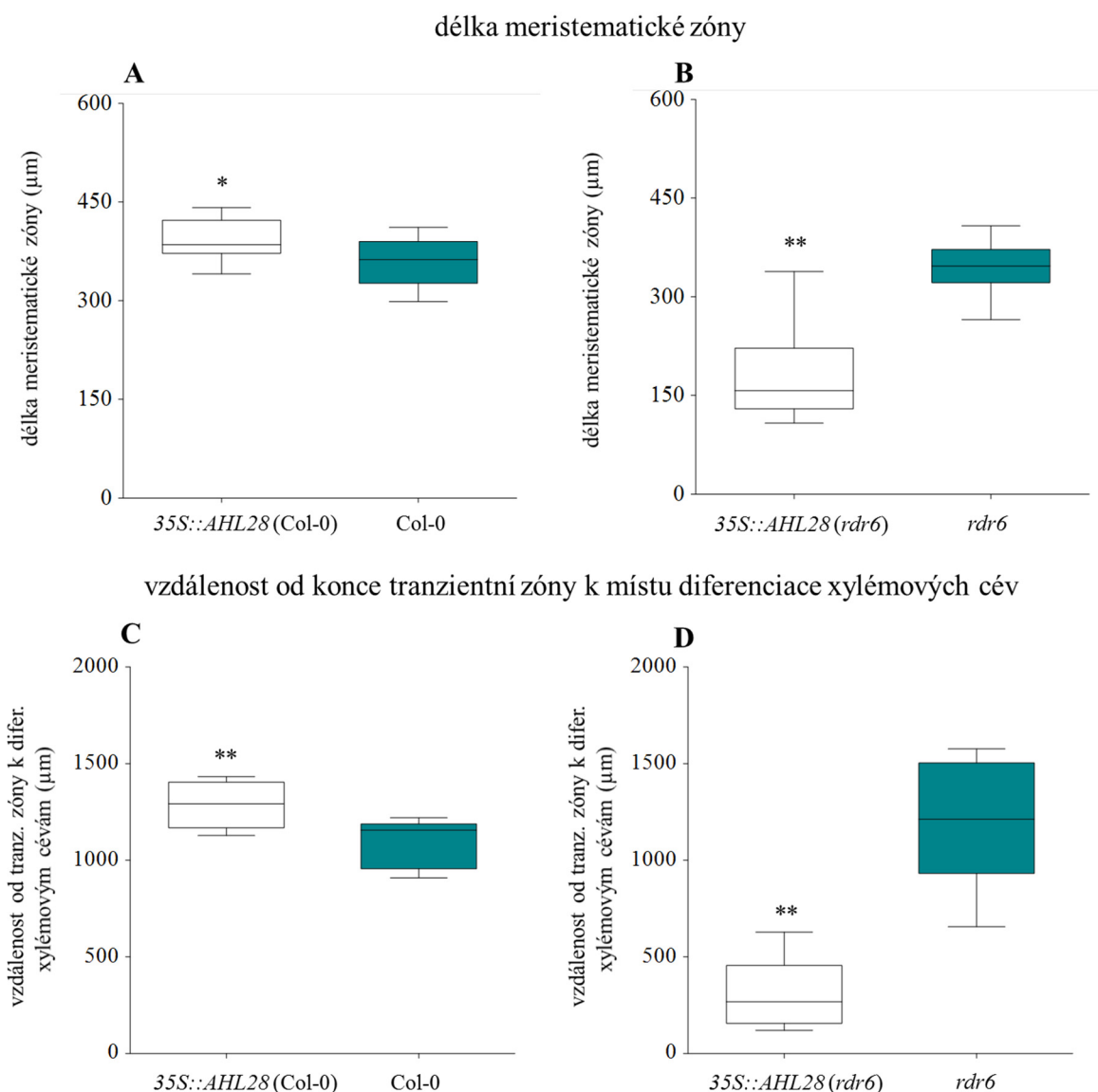
Obrázek 8: Kořenové systémy používaných linií s konstitutivní expresí *AHL28* na rozdílném transformačním pozadí s příslušnými kontrolami.

Hlavními měřenými parametry charakterizující vliv *AHL28* na kořenový systém byly délka primárního kořene a počet postranních kořenů. Jak je z grafů viditelné, tak u mutantu *ahl28* dochází ke snížení délky primárního kořene, ale počet postranních kořenů se nijak neliší od své kontroly (Graf 1A, D). U overexpresní linie *p35S::AHL28::GFP* na pozadí Col-0 dochází k signifikantnímu nárůstu délky primárního kořene i počtu bočních kořenů (Graf 1B, E), a naopak u overexprese v *rdr6* pozorujeme rapidní zkrácení hlavního kořene a úbytek postranních kořenů (Graf 1C, F).



Graf 1: *AHL28* ovlivňuje architekturu kořenového systému. (A, B,C) Vliv modulace exprese *AHL28* na délku primárního kořene mezi jednotlivými liniemi. (D,E,F) Důsledek modulace exprese *AHL28* na počet postranních kořenů. Statistická signifikance mezi liniemi $p \leq 0,01$ (**); GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test, (A) $n \geq 47$; (B,C) $n \geq 51$; (D,E,F) $n \geq 51$. Data jsou konzistentní pro 2 (A) nebo 3 (B,C,D,E,F) opakování kultivace.

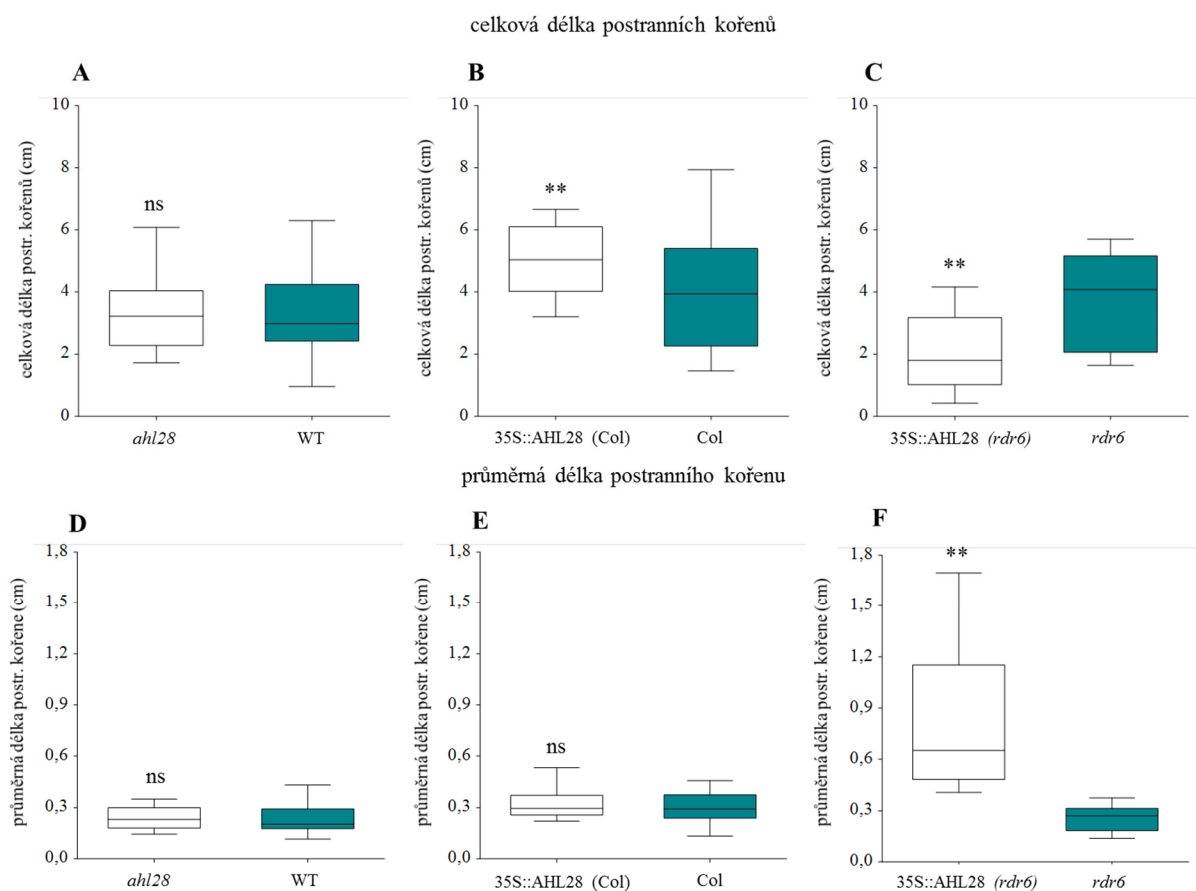
Následně jsme u dvou overexprimujících liniích změřili délky jejich meristematické zóny a porovnali je s příslušnými kontrolami. Jak je patrné, tak při konstitutivní expresi *AHL28* na pozadí Col-0 dochází k prodloužení meristematické zóny a naopak u *rdr6* je výrazně redukována velikost meristému (Graf 2A, B). Zároveň jsme si povšimly velice rychlého nástupu diferenciace u linie *p35S::AHL28:GFP* v *rdr6*, což je vyjádřeno zkrácením vzdálenosti mezi bazálním koncem tranzientní zóny a místem diferenciace xylémových cév (Graf 2D). Přesně opačný trend má konstitutivní exprese *p35S::AHL28* v Col-0, kde je tato vzdálenost delší než u kontroly (Graf 2C). Parametry nebyly měřeny u mutantu *ahl28* z důvodu později komentovaných výsledků (Kapitola 8.5.3).



Graf 2: Úroveň exprese *AHL28* ovlivňuje délku meristematické zóny a nástup diferenciacce xylémových cév. (A,B) Linie s konstitutivní expresí *AHL28* a jejich délky meristematických zón v porovnání s příslušnými kontrolami. (C,D) Vzdálenost místa počátku diferenciacce xylémových cév od konce tranzientní zóny u overexpresních linií. Statistická signifikance mezi liniemi $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,05$ (*); One-way ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test, (A,B,C,D) $n \geq 8$. Data jsou získána z jedné kultivace.

Pro ověření dalšího vlivu modulace exprese *AHL28* na architekturu kořenového systému jsme se zaměřili na postranní kořeny, konkrétně na jejich celkovou délku v kořenovém systému a na jejich průměrnou délku. V *ahl28* nedojde k žádným signifikantním změnám (Graf 3A, D). Naopak při expresi pod promotorem 35S dochází u Col-0 k navýšení celkové délky bočních kořenů a u *rdr6* mutanta dochází kvůli nízkému počtu postranních kořenů ke snížení jejich celkové délky (Graf 3B, C). Průměrná délka bočního kořene na pozadí Col-0 se nijak neliší od

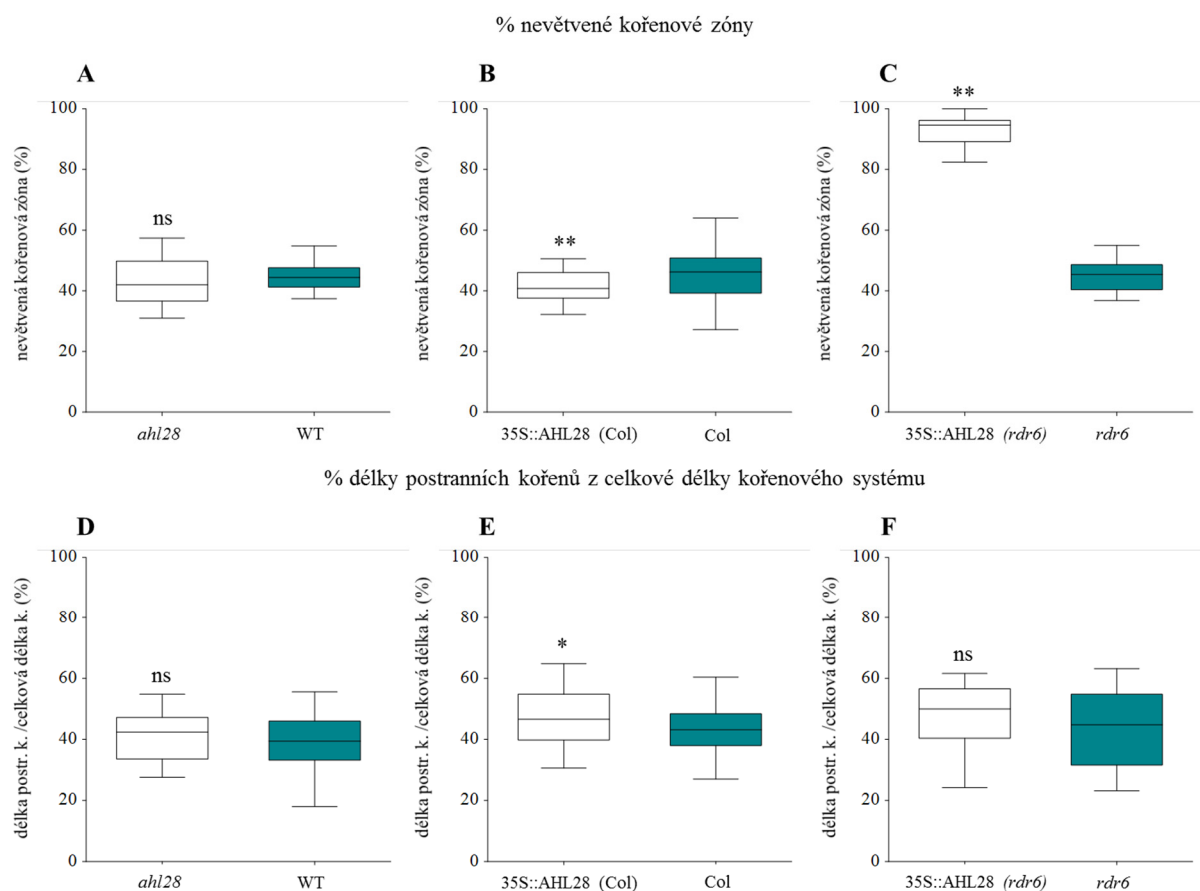
své kontroly, ale na *rdr6* pozadí je jejich malý počet kompenzován prodlouženou délkou postranních kořenů (Graf 3E, F).



Graf 3: *AHL28* moduluje délku postranních kořenů. (A,B,C) Vliv *AHL28* na celkovou délku postranních kořenů. (D,E,F) Změna průměrné délky postranních kořenů u rostlin s modulovanou expresí *AHL28*. Statistická signifikance mezi liniemi $p \leq 0,01$ (**); GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test, (A,B,C,D,E,F) $n \geq 51$. Data jsou konzistentní pro 3 nezávislé kultivace.

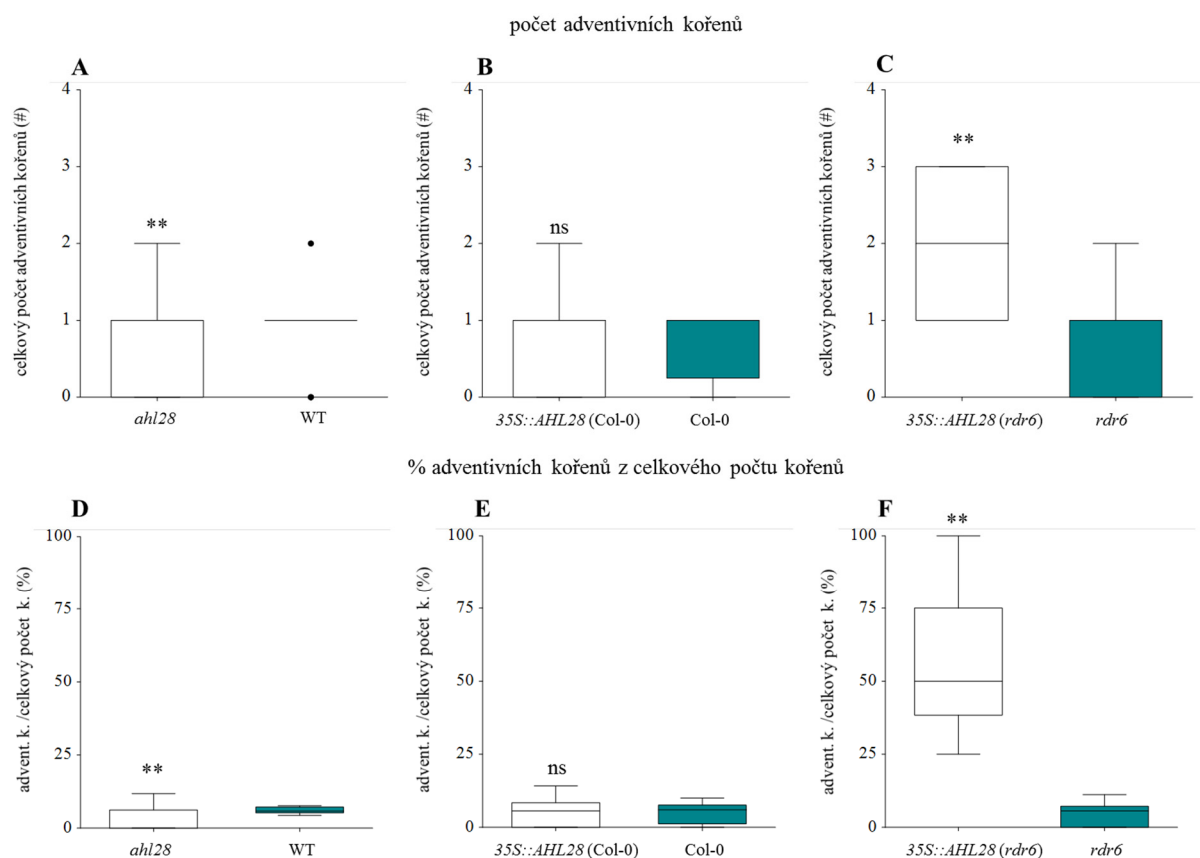
Následně jsme charakterizovali kořenový systém výpočtem poměru délky nevětvené zóny v rámci celého primárního kořene. Mutant *ahl28* opět nejevil žádné známky změny oproti kontrole (Graf 4A). Výsledky u rostlin s modulovanou expresí byly diametrálně odlišné. V Col-0 byla nevětvená část kořene kratší (Graf 4B), ale u *rdr6* bylo procento nevětveného kořene mnohem větší (Graf 4C), což koreluje s předchozími výsledky u této linie. Posledním parametrem bylo porovnání procentuálního podílu délky bočních kořenů k celkové délce kořenového systému. Mezi *ahl28* a původním genotypem není signifikantní rozdíl ani v tomto případě (Graf 4D). U overexprese v Col-0 tvoří větší procento celkové délky kořenového systému postranní kořeny (Graf 4E). Na pozadí *rdr6* není signifikantní rozdíl mezi overexpresí

a kontrolou, čehož by mohlo vyplývat, že délkou postranních kořenů rostlina kompenzuje jejich nízký počet (Graf 4F).



Graf 4: Vliv *AHL28* na poměrové zastoupení větvené a nevětvené zóny kořenového systému. (A,B,C) Zastoupení nevětvené zóny primárního kořene v celkové délce primárního kořene. (D,E,F) Procentuální zastoupení délky postranních kořenů na celkové délce kořenového systému. Statistická signifikance mezi liniemi $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,05$ (*); GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test, (A,B,C,D,E,F) $n \geq 51$. Data jsou konzistentní pro 3 kultivace.

Rozdílná úroveň exprese *AHL28* indukuje patrné změny v počtu adventivních kořenů. Při porovnání absolutního počtu adventivních kořenů je zřejmé že u *ahl28* je jejich počet nižší, ale kvůli celkově nízkému rozptylu hodnot je třeba chápat tento výsledek pouze jako předběžnou indikaci (Graf 5A). Při navýšení exprese na pozadí *rdr6* dochází k opačnému trendu, tedy k nárůstu jejich počtu (Graf 5C). Overexprese u Col-0 se v tomto ohledu nijak neliší od své kontroly (Graf 5B). Pro ověření jsme vypočítali procentuální zastoupení adventivních kořenů z celkového počtu kořenů. Dospěli jsme ke stejným závěrům jako v předchozím případě, tedy že vyřazení *AHL28* způsobí snížení zastoupení adventivních kořenů a navýšení exprese vede u *rdr6* k nárůstu procenta jež tvoří adventivní kořeny z celkového počtu kořenů (Graf 5D, F).



Graf 5: Důsledek modulace exprese *AHL28* na adventivní kořeny. (A, B,C) Celkový počet adventivních kořenů u jednotlivých linií. (D,E,F) Procentuální zastoupení adventivních kořenů v rámci všech kořenů. Statistická signifikance mezi liniemi $p \leq 0,01$ (**); One- way ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test, (A,B,C,D,E,F) $n \geq 17$. Data jsou konzistentní pro 2 kultivace.

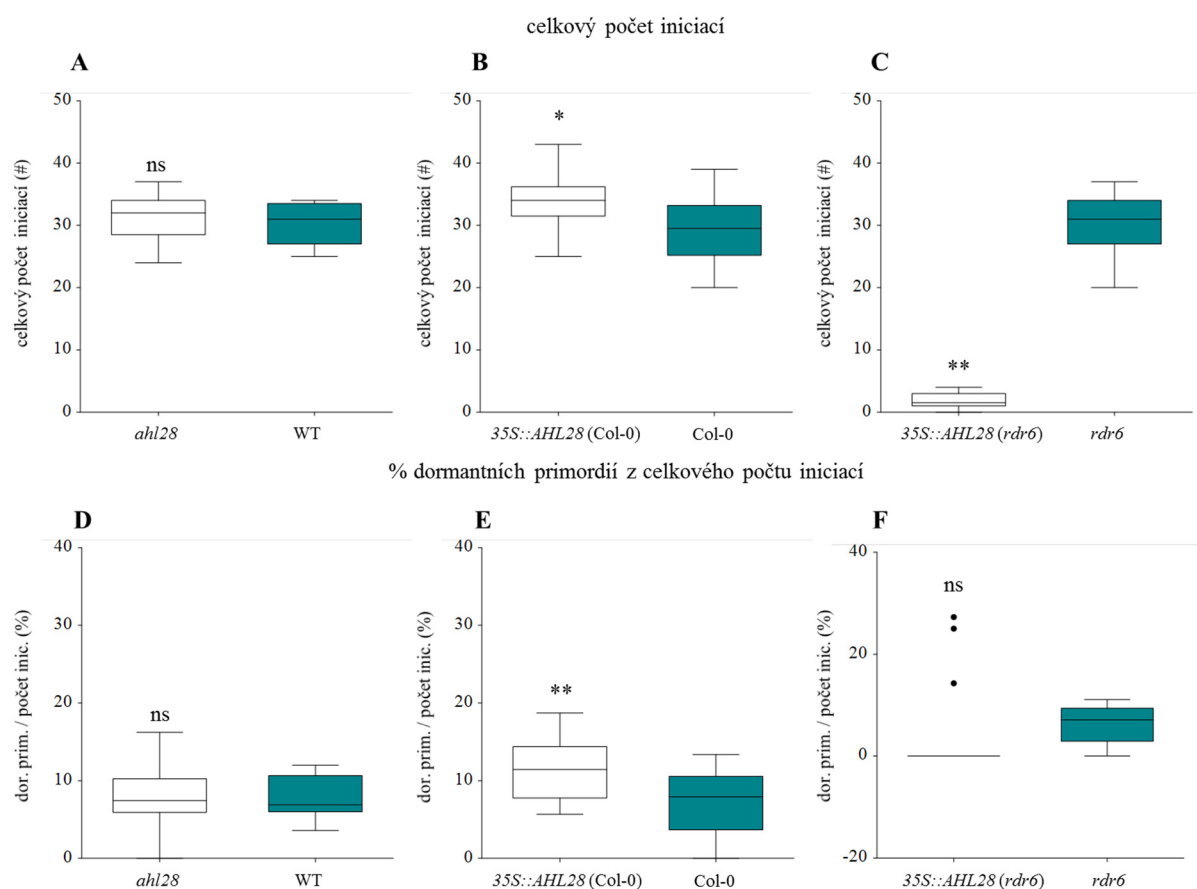
8.3. Vliv *AHL28* na iniciaci postranních kořenů

Pro bližší charakterizaci příčin signifikantních rozdílů v počtu postranních kořenů u rostlin s modulovanou expresí *AHL28* (Kapitola 8.2) byla makroskopická analýza doplněna mikroskopickým pozorováním projasněných kořenů. U preparátů byly napočítány všechny iniciace kořenových primordií i vyvinutých kořenů. Primordia byla dále podle své lokalizace rozdělena na aktivní, což jsou ta, která se vyskytují před vynořením prvního bočního kořene a nevyvíjející se, která zůstávají ve vývojových stádiích před vynořením ve větvené části kořene mezi ostatními, již vynořenými postranními kořeny. Parametry statistiky jsou blíže specifikované v Kapitole 7.8 a také v popiskách jednotlivých grafů.

8.3.1. Vliv modulace exprese *AHL28* na počet iniciací postranních kořenů

Změny v počtu postranních kořenů jsme porovnali s celkovým počtem iniciací u jednotlivých linií. Výsledky u *ahl28* korespondovaly s předchozími a indikovaly, že nedošlo k signifikantním změnám oproti divokému genotypu (Graf 6A). U overexprese v Col-0 došlo

k navýšení (Graf 6B) a v *rdr6* ke snížení celkového počtu kořenových iniciací (Graf 6C). Dále jsme se zaměřili na procentuální zastoupení nevyvíjejících se primordií abychom zjistili jaká je příčina změny počtu postranních kořenů u jednotlivých linií. U *ahl28* jsme nezjistili žádné změny ani v tomto případě (Graf 6D). Při konstitutivní expresi na pozadí Col-0 se procento ustrnulých primordií signifikantně navýší oproti kontrole (Graf 6E). U mutanta *rdr6*, jak je patrné z Grafu 6F dochází k celkové redukci všech typů primordií, tím pádem je počet vzorků s nevyvíjejícími se primordií velice nízký avšak i tak je jejich počet v porovnání s celkovými iniciacemi procentuálně stejně zastoupen jako u kontrolní rostliny.

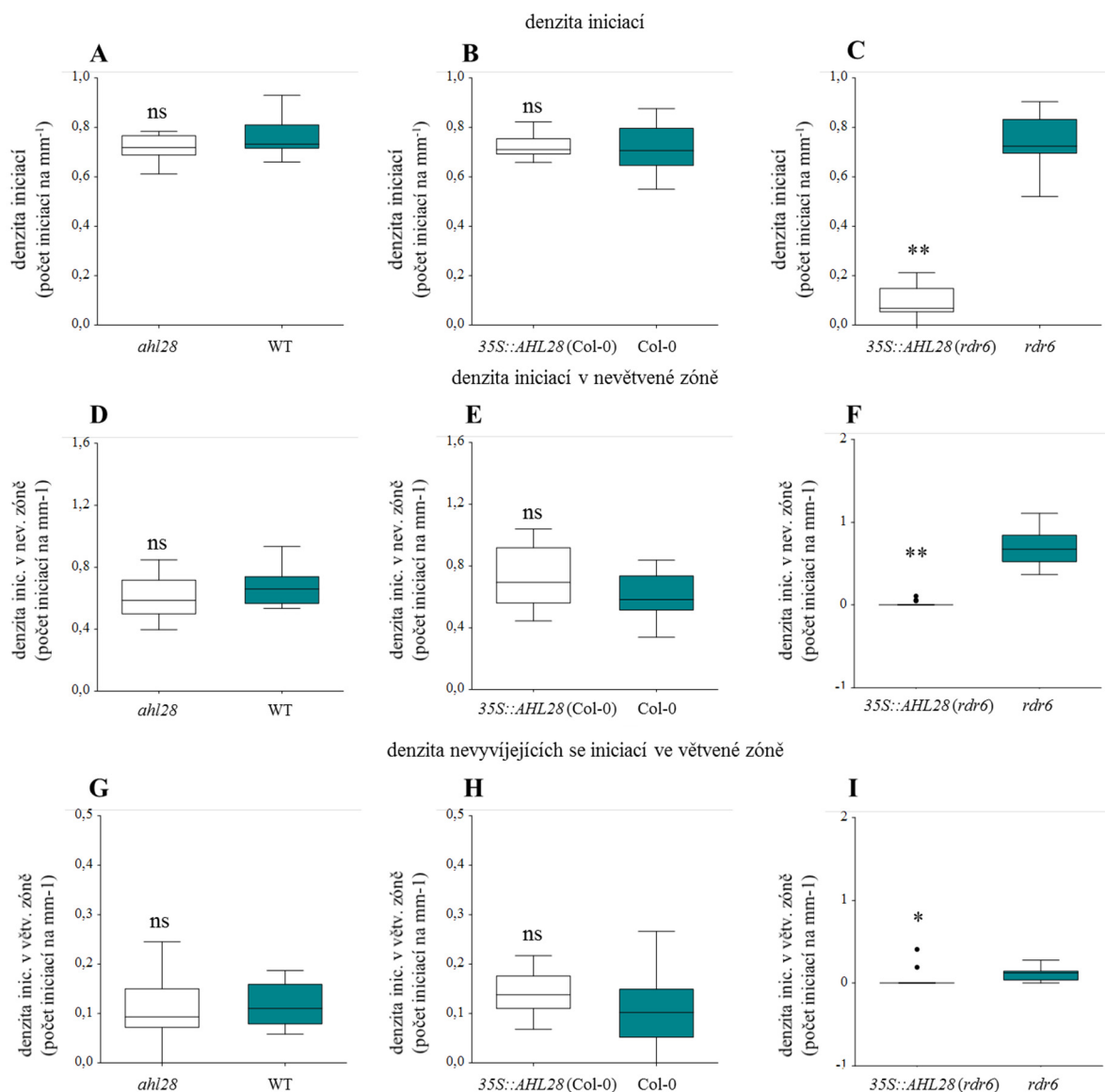


Graf 6: Důsledek modulované exprese na počet a zastoupení kořenových iniciací. (A,B,C) Celkový počet všech kořenových iniciací. (D,E,F) Procentuální zastoupení nevyvíjejících se primordií z celkového počtu iniciací. Statistická signifikance mezi liniemi $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,05$ (*); GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test, (A,B,C,D,E,F) $n \geq 17$. Data jsou konzistentní pro 2 nezávislé kultivace.

Vliv modulace exprese *AHL28* na denzitu iniciací

Kvantifikaci výsledků jsme doplnili výpočtem denzity iniciací, která je vyjádřena počtem primordií na jednotku délky kořene.

Mutant *ahl28* a overexpresní linie na pozadí Col-0 mají pravidelnou distribuci iniciací po celé délce kořene (Graf 7A, B), kdežto navýšení exprese na pozadí *rdr6* má silný vliv na boční kořeny, neboť vede k rapidnímu snížení denzity (Graf 7C). Poté jsme se zaměřili na denzitu primordií v nevětvené části kořene. Stejně jako v předchozím případě, došlo u *ahl28* a overexprese na pozadí Col-0, ke kompenzaci mezi počtem iniciací a délkou mateřského kořene, tím pádem je změna hustoty nesignifikantní (Graf 7D, E). Kořen mutantní *rdr6* nadprodukuje gen *AHL28* téměř netvoří nové iniciace, tím pádem je jejich denzita velice nízká (Graf 7F). Hustota nevyvíjejících se primordií ve větvené zóně primárního kořene byla pozorovatelná pouze u overexprese v *rdr6*, kde došlo k přesnému opaku, tedy k nárůstu oproti kontrole (Graf 7I). Je však nutno podotknout, že délka větvené zóny u těchto rostlin je velice krátká, což bude zřejmě hlavní příčinou pozorovatelného rozdílu.

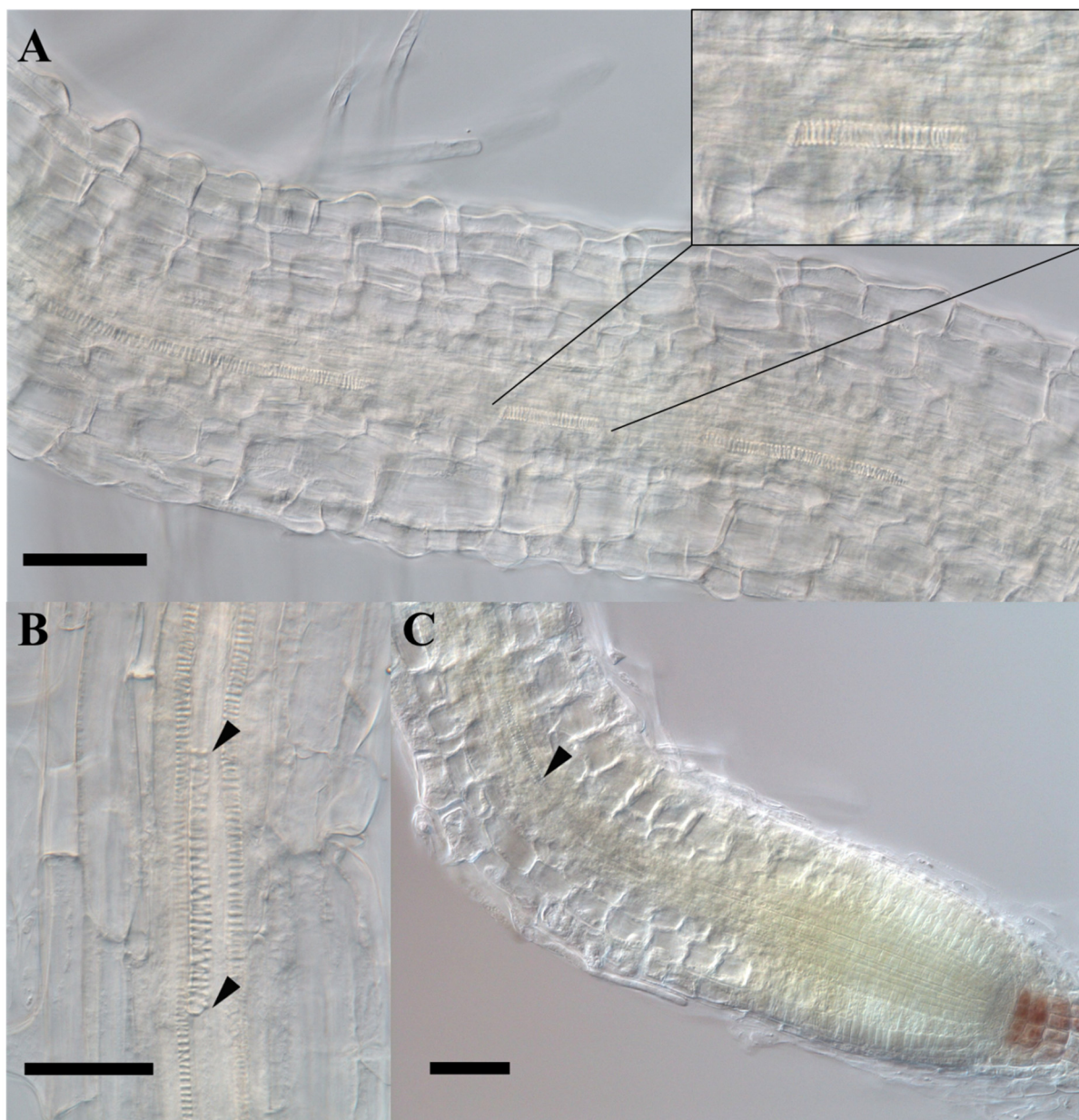


Graf 7: Denzita iniciací v rámci kořenového systému u rostlin s modulovanou expresí *AHL28*. (A,B,C) Celková denzita iniciací na primárním kořeni. (D,E,F) Denzita iniciací v nevětvené zóně kořene. (G,H,I) Denzita nevyvíjejících se primordií ve větvené zóně primárního kořene. Statistická signifikance mezi liniemi $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,05$ (*); One-way ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test, (A,B,C,D,E,F,G,H,I) $n \geq 13$. Data jsou získána z jedné kultivace.

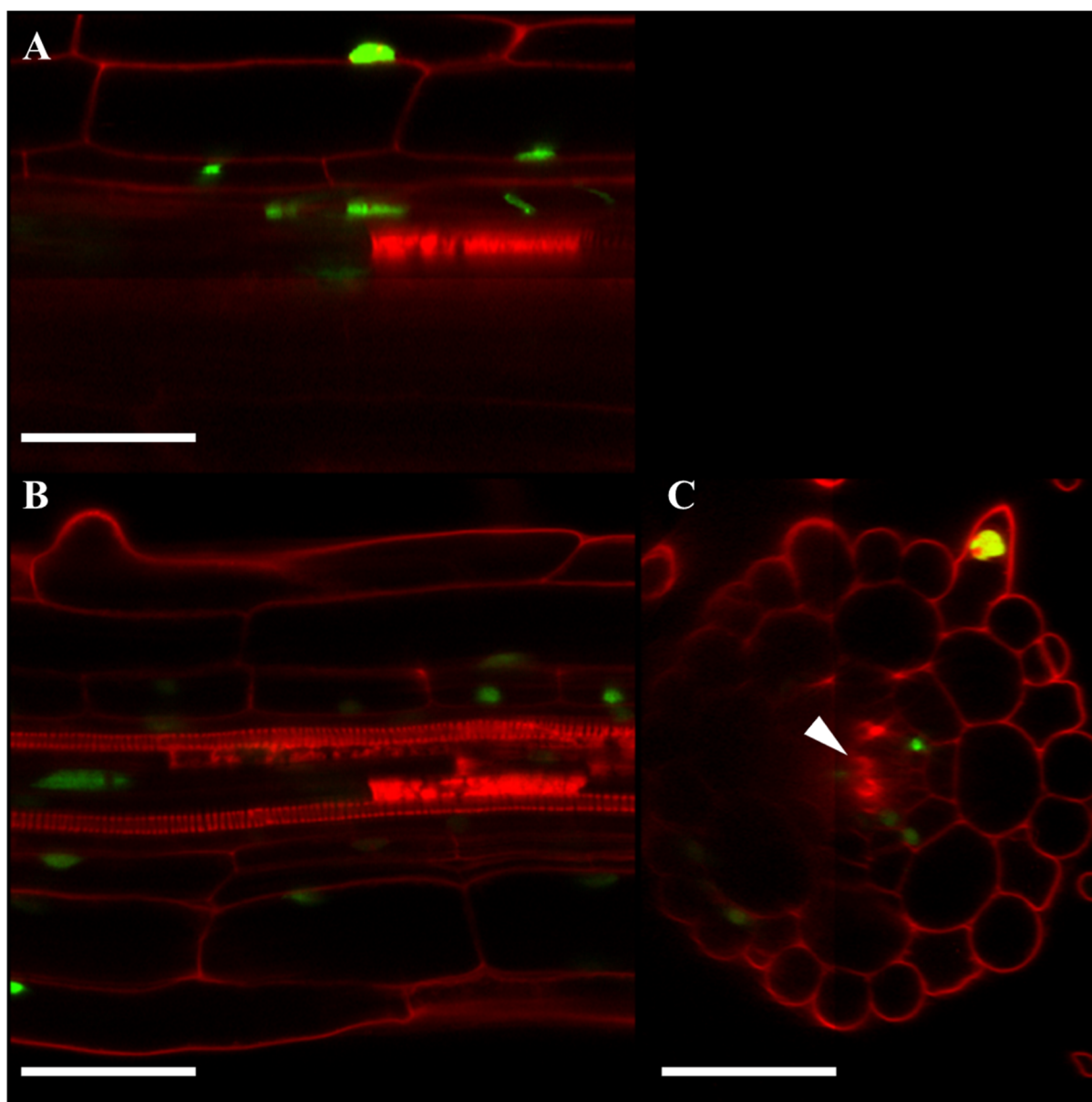
Ovlivnění vývoje středního válce

Gen *AHL28* exprimovaný pod konstitutivním promotorem *35S* na pozadí *rdr6* má výrazný vliv na architekturu kořene. Kořenový systém je redukován, dochází k potlačení vývoje iniciací kořenových primordií a má výrazně snížený počet postranních kořenů. Ovlivněná je zároveň i organizace jednotlivých vrstev pletiv středního válce, což je dobře patrné při diferenciaci xylému. V rámci celého kořene jsou xylémové cévy často diskontinuální a zároveň se často objevují ektopicky indukované cévní elementy (Obrázek 9 a 10). Tato linie má také výrazně zkrácenou meristematickou zónu a brzkou diferenciaci xylémových cév. Zároveň se u ní

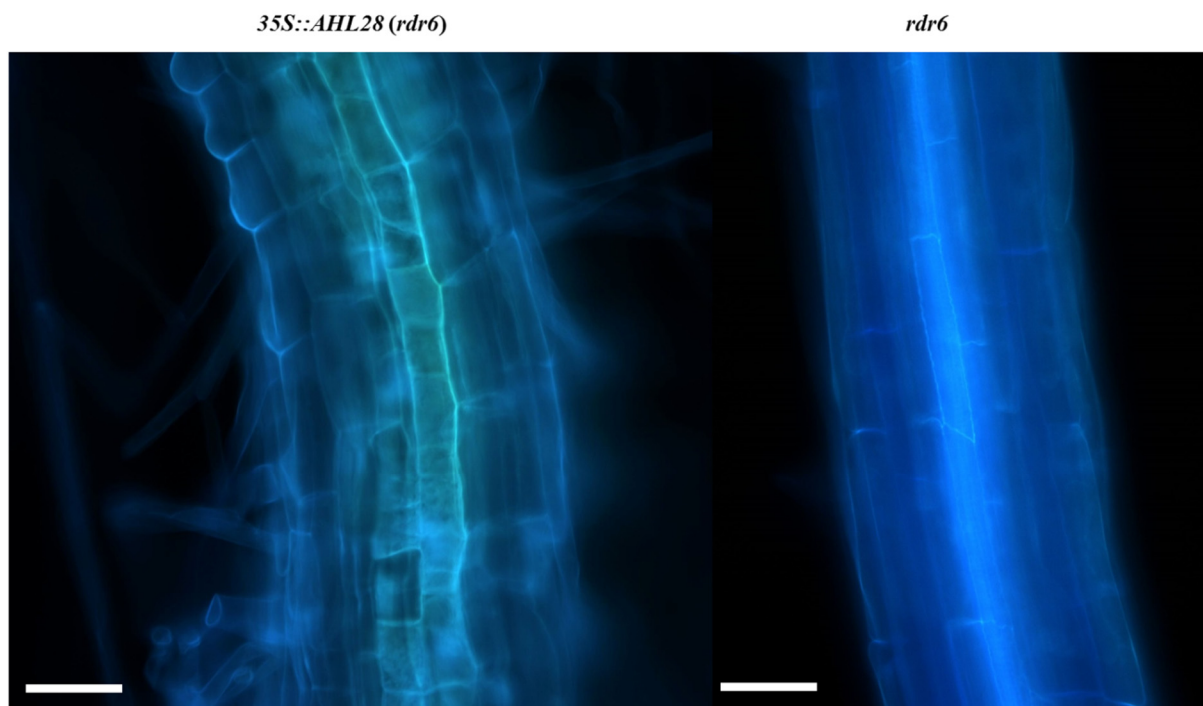
vyskytují zmnožené a tvarově nepravidelné buňky endodermis, které mají silnější buněčné stěny (Obrázek 11). Trend silnějších buněčných stěn se zdá být v rámci celého diferenciovaného kořene, ale zatím nebyl tento parametr kvantifikován.



Obrázek 9: Změny anatomické struktury kořene vlivem navýšené exprese *AHL28*. (A) Primární kořen s viditelným přerušením jediné xylémové cévy. (B) Úsek plně diferenciovaného kořene s ektopickým cévním elementem, jehož konce jsou značeny šipkami. (C) Snímek kořenové špičky s vyznačeným počátkem diferenciací xylémové cévy. Měřítka značí 50μm.



Obrázek 10: Vnitřní struktura kořene linie *p35S::AHL28::GFP* na pozadí *rdr6* s ektopicky vytvořeným protoxylémovým elementem v místě metaxylému. (A) Rovina X (B) Rovina Y (C) Rovina Z s šipkou značící nadbytečný protoxylémový element v xylémové desce. Měřítka mají velikost 50 μ m.



Obrázek 11: Buňky endodermis u *p35S::AHL28:GFP (rdr6)* a její kontroly. Měřítka je 50 μm .

8.4. *AHL28* a jeho reakce na auxin

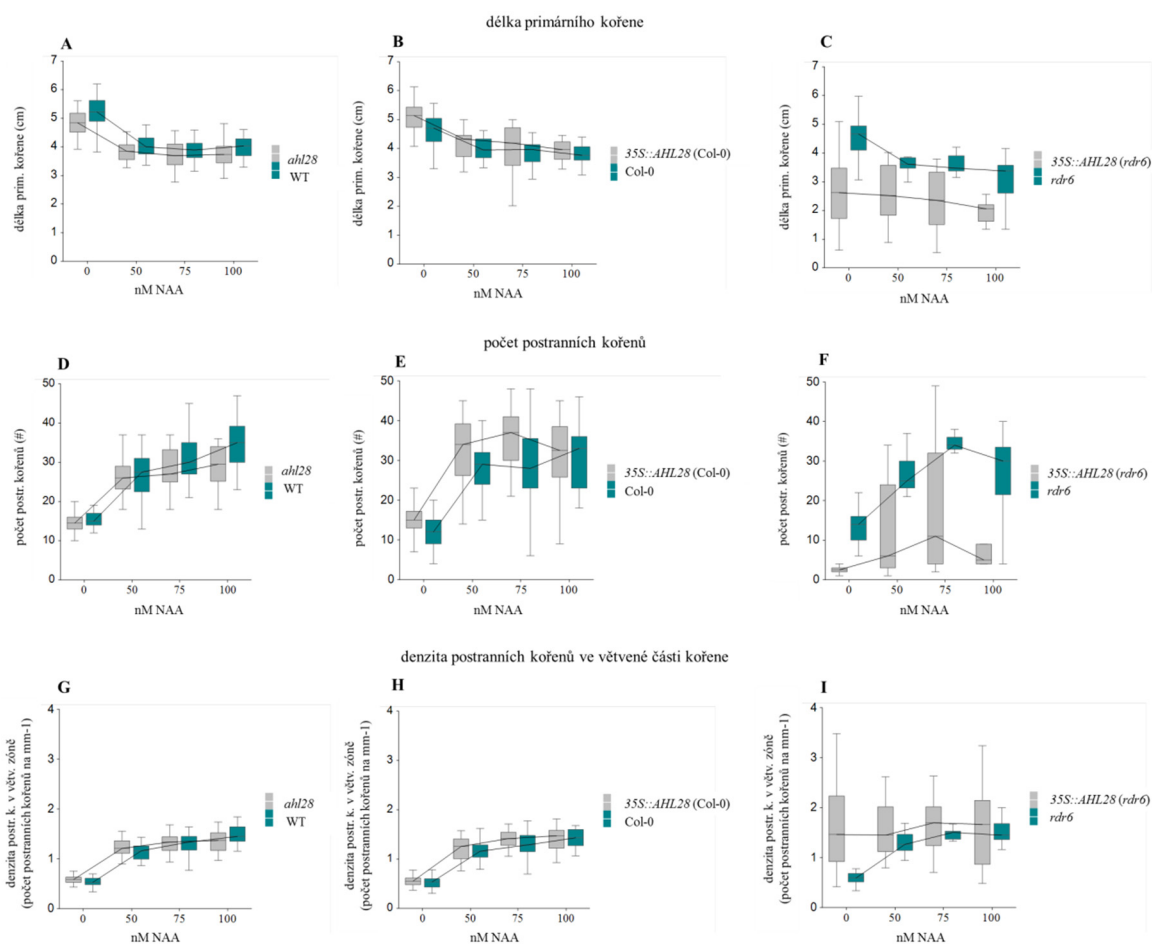
Po fenotypové analýze jsme linie konfrontovali s exogenně přidaným auxinem do media, jelikož změny v počtu iniciací a celkové fenotypové změny v kořeni naznačovaly, že by u nich mohlo docházet k narušení auxinové signalizace. Pro potřeby experimentu jsme zvolili gradient koncentrací o hodnotách 50, 75 a 100 nM NAA v médiu (viz Kapitola 7.1). Použité statistické metody jsou blíže popsány v Kapitole 7.8 a také u jednotlivých grafů.

8.4.1. Vliv auxinu na kořenový systém rostlin s modulovanou expresí *AHL28*

Makroskopická analýza byla nejprve zahájena porovnáním změny délky primárního kořene v závislosti na přidaném auxinu. Jak je z grafů patrné, tak linie *ahl28* i linie s konstitutivní expresí *AHL28* na pozadí Col-0, reagují v porovnání se svými kontrolami totožně, tedy se zvyšující se koncentrací auxinu, dochází ke zkrácení délky primárního kořene, což je přirozená reakce na větší množství auxinu. Zároveň dochází ke smazání signifikantních rozdílů v délce hlavního kořene mezi liniemi a kontrolou, které byly popsány na médiu bez přidaného NAA (Graf 8A, B). Na pozadí *rdr6* je reakce lehce odlišná, jelikož není patrná změna v délce kořene na médiu s nulovou a 50 nM koncentrací NAA, u vyšších koncentrací dochází také ke stejnému trendu zkracování kořene jako u kontroly. Možným odůvodněním může být změna citlivosti linie k auxinu, ale pravděpodobnějším vysvětlením je, že celkový růst této linie je narušen a zpomalen, tím pádem se reakce dostavila až po delší době kultivace. Rozdíly v délce kořene u linie *p35S::AHL28* v *rdr6* a její kontroly zůstávají navzájem stále signifikantní (Graf 8C).

Při porovnání počtu postranních kořenů mutantu *ahl28* a původního genotypu zjistíme, že u obou dochází ke stejnému nárůstu při nižších koncentracích, ale při nejvyšší má kontrola markantnější nárůst počtu bočních kořenů než mutant (Graf 8D). Overexprese v Col-0 má stejný nárůstový trend v závislosti na koncentraci NAA (Graf 8E). U *rdr6* dochází nejprve k nárůstu počtu a při nejvyšší koncentraci je opačný trend, pravděpodobně kvůli zvýšené citlivosti linie na auxin (Graf 8F).

Následně byl počet postranních kořenů vztažen na jednotku délky větvené zóny kořene a výsledky prvních dvou dvojic kopírují stejný scénář, tedy že se zvyšující se koncentrací dochází k nárůstu denzity nezávisle na typu linie (Graf 8G, H). Navýšení exprese u *rdr6* se na denzitě neprojeví, pokud jsou rostliny pěstovány na nulové či nízké koncentraci NAA, ale při jejím zvýšení dochází k vzrůstu denzity postranních kořenů (Graf 8I).



Graf 8: Vliv exogenně dodaného auxinu na strukturu kořenového systému u rostlin s modulovanou expresí *AHL28*. (A,B,C) Délka primárního kořene porovnaná mezi jednotlivými liniemi na narůstající koncentraci NAA. (D,E,F) Rozdíly v počtu postranních kořenů v závislosti na zvyšující se koncentraci auxinu. (G,H,I) Vliv NAA na denzitu postranních kořenů ve větvené zóně primárního kořene u rostlin s modulovanou expresí *AHL28*. Statistická signifikance mezi liniemi v rámci všech koncentrací NAA $p \leq 0,05$ (A,B,C,D,E,F,I); signifikance mezi koncentracemi 0 a x nM NAA $p \leq 0,05$

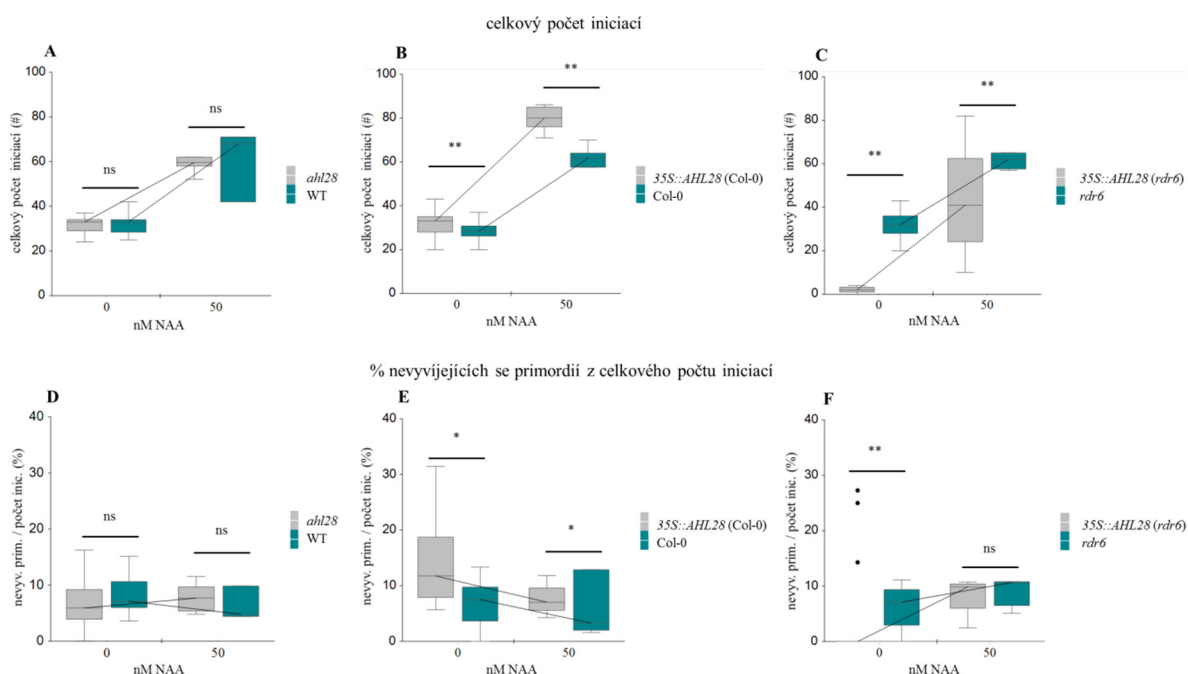
(A,B,C,D,E,F,G,H,I); GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test, (A,B,C,D,E,F,G,H,I) $n \geq 68$. Data jsou konzistentní pro 2 opakování.

Vliv auxinu na tvorbu kořenových iniciací

Fenotypové změny v rámci počtu postranních kořenů jsme dále prověřili i mikroskopickou analýzou projasněných preparátů, kterým jsme napočítali všechny iniciace, jež jsme rozdělili podle vývojových stádií stejně jako v Kapitole 8.3. Pro tento experiment byly použity pouze rostliny z nulové a 50 nM koncentrace NAA.

Vliv auxinu na celkový počet iniciací u *ahl28* je shodný s původním genotypem, jelikož u obou dochází k obdobnému signifikantnímu nárůstu v jejich počtu (Graf 9A). Ektopickou expresí *AHL28* u Col-0 i *rd6* docílíme také nárůstu počtu iniciací v závislosti na koncentraci auxinu, ale zároveň zůstanou zachovány i rozdíly v porovnání s kontrolami (Graf 9B, C).

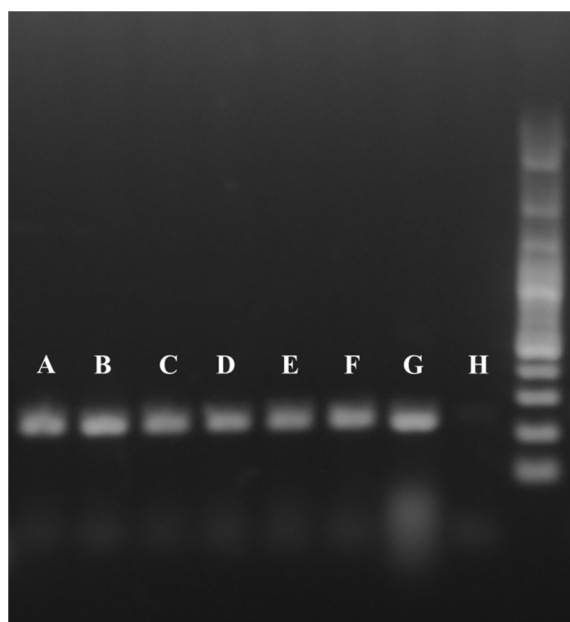
Procentuální zastoupení nevyvíjejících se primordií se u *ahl28* neliší na koncentraci auxinu (Graf 9D). Overexpresní linie v Col-0 po vystavení auxinu snižují procento ustrnulých iniciací (Graf 9E) a linie na pozadí *rd6* naopak produkují celkově větší množství iniciací, tím pádem je i procento nevyvíjejících se vyšší. Zároveň však na auxinovém médiu pojde ke smazání rozdílů mezi mutantem a kontrolou, ale tento fakt může být způsoben malým počtem vzorků (Graf 9F).



Graf 9: Vliv exogenně dodaného auxinu a modulované exprese *AHL28* na počet kořenových iniciací. (A,B,C) Celkový počet iniciací linií s modulovanou expresí *AHL28* na rozdílných koncentracích NAA. (D,E,F) Procentuální zastoupení nevyvíjejících se primordií z celkového počtu iniciací v závislosti na přidaném auxinu. Statistická signifikance mezi liniemi $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,05$ (*); signifikance mezi koncentracemi 0 a 50 nM NAA $p \leq 0,05$ (A, B, C, E); GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test, (A,B,C,D,E,F) $n \geq 20$. Data jsou použita z jednoho opakování.

8.4.2. Míra exprese *AHL28* v použitých liniích

Jelikož se pracovalo s liniemi s modulovanou hladinou exprese *AHL28* bylo nutné provést kvantifikaci transkriptu zmíněného genu. Z kořenové masy jednotlivých rostlin bylo vyizolováno RNA a následně bylo reverzní transkriptázou přepsáno do cDNA. Před samotnou qPCR byla provedena semikvantitativní PCR se specifickými primery pro *AHL28*, při níž se bohužel ukázalo, že je produkt patřičné délky přítomen ve všech liniích včetně použitého pozitivně vyselektovaného homozygotního inzerčního mutanta *ahl28* (Obrázek 12). U ostatních zároveň nebylo možné rozlišit úroveň hladiny transkriptu (Obrázek 12). Přesto jsme provedli qPCR, která však také neměla výpovědní hodnotu, kvůli velkému rozptylu mezi technickými opakováními a výrazným pozadím gDNA. Problémem při těchto experimentech byly i časté kontaminace i přes práci se sterilním materiálem a špičkami s filtrem. Celý pokus se bude muset ještě nejméně jednou zopakovat s větší obezřetností vůči enzymatickým a genomovým kontaminacím RNA.



Obrázek 12: Výsledek semikvantitativní PCR pro gen *AHL28*. Pořadí vzorků (A) *ahl28*, (B) WT, (C) *35S::AHL28 (rdr6)*, (D) *rdr6*, (E) *35S::AHL28 (Col-0)*, (F) *Col-0*, (G) pozitivní kontrola genomová DNA, (H) negativní kontrola master mix s H₂O. Vše je poměřováno s GeneRuler 100bp Plus.

8.4.3. Výsledky křížení

Pro sledování vlivu *AHL28* na auxinovou signalizaci byli vytvořeni kříženci mezi liniemi s modulovanou expresí *AHL28* a linií *DR5::GUS*, která umožní vizualizovat přítomnost auxinu v rostlině. Kříženci byli nejprve pozitivně genotypováni na přítomnost markerové linie *DR5::GUS* a inzerční T-DNA v případě mutanta *ahl28* nebo na sekvenci od promotoru *35S* až po GFP u overexpresních linií. Tímto byli vyselektováni kříženci *ahl28* a *DR5::GUS*.

U overexpresních linií na pozadí *rdr6*, kde vzhledem k výraznému fenotypu byl očekáván výsledek zobrazující narušení auxinového toku rostlinou, vyvstal při křížení druhotný problém. Linie *rdr6* má v genu pro RNA-dependentní RNA polymerázu 6 obsaženu bodovou mutaci tvořící STOP kodon, což ovlivňuje jeho funkci a v linii vyřadí schopnost umlčování pomocí RNA. Tato vlastnost byla ale při křížení ztracena vnesením kompletní verze genu z parentální rostliny použité při křížení a vzhledem k povaze bodových mutací by bylo obtížné je detekovat pomocí standartního genotypování. Rostliny s konstitutivní expresí tak byly ještě druhotně selektovány na antibiotikových plotnách. Tento krok, byl ale neúspěšný, jelikož všechny rostliny, i když byly pozitivně genotypovány na přítomnost T-DNA, kultivaci se selekčními markery, nepřežily. Posledním pokusem pro vybrání správně nakřížených linií probíhal pomocí fenotypové analýzy, jelikož konstitutivní exprese na obou pozadí má výrazný fenotypový vzhled, ale ani tímto pokusem jsme se nedobrali pozitivního výsledku. Možností jak docílit vizualizace reportéru *DR5::GUS* v našich liniích by mohla být např. jejich druhotná transformace.

9. Diskuze

9.1. Míra exprese *AHL28* v použitých liniích

Porovnáním výsledků semikvantitativní PCR transkriptomu používaných linií a příslušných kontrol jsme prokázali přítomnost transkriptu genu *AHL28* ve všech námi používaných liniích včetně předpokládaného inzerčního mutanta *ahl28*. Linie SAIL_646_A02, s inzercí 5' UTR nepřepisované oblasti genu *AHL28* nevede k vyřazení, ale nejspíše pouze k částečnému snížení exprese. Hypotézu o alespoň částečném ovlivnění transkripce genu *AHL28* podporují naměřené fenotypové změny, jako je změna délky primárního kořene oproti odkřížené kontrole. Skutečnou úroveň změny transkripce se pomocí qPCR během práce naměřit nepodařilo. Bohužel další inzerční mutanty tohoto genu mimo 5' UTR nepřepisovanou oblast nejsou z veřejných depozitů dostupné, a proto bude třeba pro sledování důsledků vyřazení *AHL28* použít jiný systém, např. s CRISPR/Cas9 editací.

Další používané linie mají ektopickou expresi *AHL28* vedenou silným promotorem 35S. Gen je tedy spuštěn i mimo svojí přirozenou expresní doménu a je přítomen i v pletivech, kde se u původního genotypu nevyskytuje, čímž může být způsobena výrazná fenotypová změna (Mitsuhara et al., 1996).

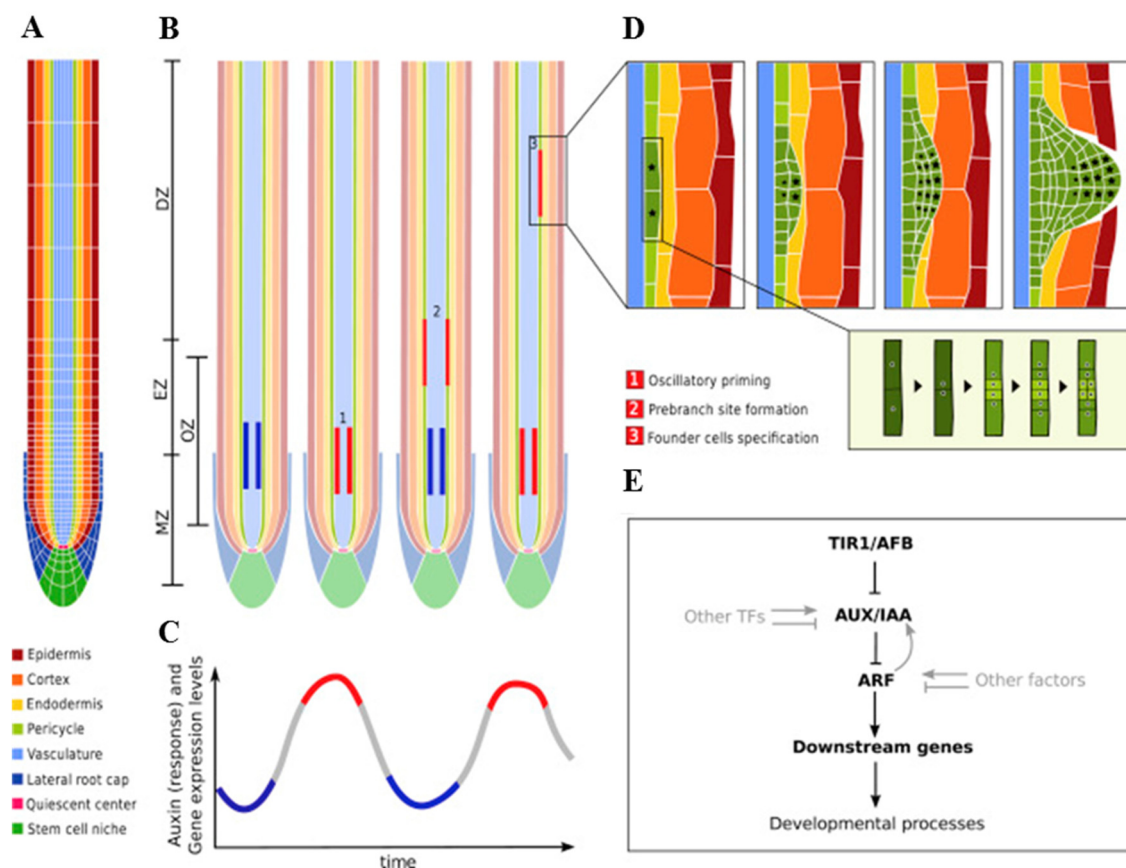
Vložení konstruktu *p35S::AHL28:GFP* do rostlin s jinou úrovní postranskripční regulace mělo rozdílný a protichůdný vliv na fenotyp, což nás vede k vytvoření hypotézy, že i úroveň stabilního transkriptu je v overexpresních liniích rozdílná. Overexpresní mutant na pozadí Col-0 by tak ve skutečnosti neměl navýšenou expresi, ale naopak sníženou vlivem spojení silného konstitutivního promotoru se slabším NOS terminátorem, což může zapříčinit postranskripční umlčení exprese (Elmayan et al., 1998; Que et al., 1997). Zdá se proto pravděpodobné, že prezentovaný fenotyp této linie je tedy přisuzován efektu snížení exprese genu *AHL28*.

V linii *p35S::AHL28:GFP* na pozadí *rdr6* by naopak efekt potlačení posttranskripčního umlčení vedl k navýšení exprese genu *AHL28*, jelikož mutant *rdr6* netvoří RNA dependentní RNA polymerázu 6, která je nutná k produkci siRNA a účastní se tak jedné dráhy posttranskripčního umlčování (Deuschle et al., 2006; Vaucheret, 2005). Toto vysvětlení by bylo konzistentní s pozorovanými fenotypy a vysvětlovalo by gradient změn v korelaci s úrovní exprese genu *AHL28*. Tento předpoklad je nutné znovu ověřit pomocí qPCR

9.2. Funkce *AHL28* jako regulátoru vývoje primárního kořene

Vývoj primárního kořene je dynamický proces, který je ovlivněn různými faktory na transkripčních i fytohormonových regulačních úrovních. Při jeho řízení dochází k propojení vnitřního vývojového programu s fytohormonovou signalizací a dalšími řídicími okruhy, což dává rostlině možnost regulovat růst i organogenezi a reagovat tak na okolní podmínky. Klíčovým místem vývoje kořenového systému je apikální meristém, který jako jediný dává vznik novým buňkám v kořeni, a na něj navazující tranzientní zóna, jež tvoří rozhraní mezi meristematickými aktivně se dělicími buňkami a buňkami s počínající diferenciací, které vstupují do elongační zóny. Dochází ke spuštění vývojových změn specifických pro buněčné osudy diferencujících pletiv (Motte et al., 2019; Verbelen et al., 2006). Obě zóny jsou výrazně ovlivňovány interakcí regulačních drah cytokininů s auxinu (Aloni et al., 2006). Vzájemný vztah mezi uvedenými fytohormony je v tomto případě antagonistický, jelikož auxin udržuje dělivou schopnost buněk, kdežto cytokininy urychlují jejich diferenciaci. Vzájemná rovnováha vytváří správný poměr nově generovaných a diferencujících se buněk, čímž je zachována správná struktura, funkce a velikost apikálního meristému během růstu kořene (Dello Ioio et al., 2007; Hejácíko and Benkova, 2009). Mechanismus auxinového působení spočívá v rovnováze mezi vzájemně interagujícími auxinovými represory Aux/IAA a auxin dependentními faktory ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR). Auxin svým působením spustí degradaci proteinů rodiny Aux/IAA, čímž dojde k aktivaci ARF a jim podřízeným genům a naopak cytokininy mají schopnost posilovat funkci auxinových represorů Aux/IAA (Obrázek 13) (Dello Ioio et al., 2008; Weijers et al., 2005).

Příkladem spolupráce auxinu a cytokininů je určení velikosti meristému pomocí regulace diferenciací v přechodové zóně, která je započata přijetím cytokininového signálu receptorem AHK3 (HISTIDINE KINASE 3), který následně vyšle signál do jádra, kde se spustí exprese genů pozitivní odpovědi na cytokinin *ARR* typu B (*ARABIDOPSIS THALIANA RESPONSE REGULATOR*), jež aktivují inhibitor auxinové odpovědi *IAA3/SHY2* (*INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 3/SHORT HYPOCOTYL 2*), který negativně reguluje ARF a přeneseně potlačuje tvorbu PIN proteinů (PIN FORMED), a tím tvorbu auxinového maxima. Naopak při vyšší auxinové koncentraci je *IAA3/SHY2* degradován a buňka si stále udržuje meristematickou aktivitu. U ztrátových mutantů v cytokininové signální dráze, jako je *ahk3* nebo *shy2* byla popsána prodloužená meristematická zóna a delší primární kořen a naopak, když je vytvořen násobný mutant několika PIN proteinů *pin1pin3pin7* je apikální meristém zkrácený a u něj dochází k rychlejší diferenciaci kvůli destabilizaci auxinového toku a neschopnosti rostliny vytvořit auxinová maxima (Dello Ioio et al., 2008, 2007).



Obrázek 13: Schéma působení auxinu na vývoj kořenového systému. (A) Popis vrstev primárního kořene. (B) Místa oscilace auxinové koncentrace, kde modrá značí minimum a červená maximum. (C) Graf velikosti hladiny auxinu a jím ovlivněných genů v závislosti na čase. (D) Fáze formování primordia. (E) Stručný mechanismus auxinového působení. Převzato a upraveno z (Teixeira and Tusscher, 2019)

Délka primárního kořene a jeho meristému je závislá také na dalších fytohormonech, jako jsou gibereliny. Jejich přítomnost u klíčící rostliny je nutná pro nabuzení a udržení dlouhivého růstu kořene (Ubeda-Tomás et al., 2008). Působení giberelinů je specifické pro endodermis tranzientní zóny, která je jejich působením stimulována k růstu a dělení, čímž nepřímo ovlivní i růst okolních pletiv kořene a velikost meristému (Ubeda-Tomás et al., 2008). Působením giberelinů je aktivována degradace DELLA proteinů, jako jsou *GAI* (*GIBBERELIC ACID INSENSITIVE*) a *RGA* (*REPRESSOR OF GA*), které působí jako inhibitory růstu. Pokud má rostlina během svého vývoje nedostatek giberelinů, tak nedokáže odbourat DELLA represory, což jí způsobí fenotyp zkrácené meristematické oblasti a krátkého primárního kořene (Ubeda-Tomás et al., 2016).

Nejenom fytohormony ale i například reaktivní formy kyslíku (ROS) a jejich distribuce se podílejí na ustanovení poměru mezi buněčným dělením a diferenciací buněk v apikálním meristému nezávisle na auxinu (Yu et al., 2016). Činnost meristematické zóny je udržována přítomností superoxidu ($\cdot\text{O}_2^-$) a naopak diferenciaci je nabuzená peroxidem vodíku (H_2O_2).

Tranzientní zóna je místem, kde dochází ke změně jejich poměru, která je ovládána genem *UPBI* (*UPBEAT1*), jenž moduluje expresi peroxidáz účastnících se na regulaci některých ROS. Mutantní rostlina *upb1* má výrazně prodloužený meristém i celkově delší primární kořen (Tsukagoshi et al., 2010).

Příbuzný gen z rodiny *AHL*, *AHL18*, má popsanou změnu fenotypu kořenového meristému a délky kořene v závislosti na úrovni své exprese. Navýšením hladiny transkriptu genu *AHL18* dojde k prodloužení primárního kořene i jeho apikální meristematické zóny a naopak u inzerčního mutantu *ahl18* je výsledek opačný. Důvodem je rozdílná rychlost produkce buněk apikálním meristémem (Šírl et al., 2020).

Regulační efekt příbuzných *AHL* v závislosti na úrovni exprese však nutně nemusí být shodný, neboť fenotypový projev reprezentovaný růstem primárního kořene rostlin se sníženou expresí genů *AHL28* a *AHL18* je přesně opačný. K diametrálně odlišným výsledkům dospějeme i u overexpresních mutantů a můžeme konstatovat, že při navýšené expresi genu *AHL28* pod promotorem *35S* (*rdr6*) je fenotypový projev mnohem intenzivnější. Expresní domény těchto genů se neprotínají, neboť *AHL18* je lokalizován v meristematické zóně a konkrétně v pokožce a pericyklu, kdežto *AHL28* je produkován v primární kůře. Přestože mají oba geny vliv na délku kořene, tak zřejmě každý na jiné úrovni regulace.

Popsané změny v délce primárního kořene a strukturní změny apikálního meristému ukazují že *AHL28* bude jedním z dalších regulačních faktorů ovlivňující vývoj kořenového systému. Vzhledem k provedeným experimentům a fenotypovým výsledkům se nejvíce přikláníme k myšlence vzájemného funkčního propojení s dráhou cytokininů. Místo exprese, tedy přechodová zóna odpovídá místu počátku diferenciac buněk právě pod vlivem cytokininů. Navýšením exprese *AHL28* docílíme zkrácení délky primárního kořene a meristému a zároveň dochází k brzkému nástupu diferenciac, což koreluje s fenotypy rostlin s nadbytkem cytokininů (Dello Ioio et al., 2008, 2007). Na druhé straně předpokládané snížení hladiny *AHL28* vede k výraznému prodloužení primárního kořene, meristematické zóny a opožděnému nástupu diferenciac, stejně jako k tomu dochází u rostlin s narušenou cytokininovou dráhou, která posouvá lokální rovnováhu ve prospěch auxinu. Použití exogenního auxinu v médiu se nabízelo jako logický krok vzhledem k fenotypovým projevům v délce primárního, jež se podobají několika násobným mutantům v *PIN* genech, nebo konstitutivní exprese *IAA3*/*SHY2* (Blilou et al., 2005; Dello Ioio et al., 2007). Dodaný auxin plně nepotvrdil, ale ani nevyvrátil teorii o souvislosti *AHL28* s auxin-cytokininovou rovnováhou, jelikož nedošlo ke kompenzaci fenotypu způsobeného modulací *AHL28*. Není tedy jasné, jestli vůbec nebo na jaké úrovni je *AHL28* do této signalizace zapojen. Pokud se ale zaměříme na výsledky u line

p35S::AHL28:GFP na pozadí *rdr6*, tak je naznačená snížená citlivost vůči auxinu, což je znak, který nese i mutantní rostlina s nadprodukcí *IAA3/SHY2*. Linie se zároveň podobají i v celkovém fenotypovém projevu zkráceného primárního kořene i redukovaných iniciací (Dello Ioio et al., 2007; Tian and Reed, 1999). Z doposud provedených pokusů samozřejmě není možné přesně umístit *AHL28* do auxin-cytokininové regulace vývoje apikálního meristému, ale jelikož se jedná o transkripční faktor se schopností interagovat s jinými transkripčními faktory, mohl by teoreticky díky své reakci vůči exogennímu auxinu a sdílenými fenotypovými znaky kooperovat s genem *IAA3/SHY2* a fungovat tak, jako negativní regulátor auxinové odpovědi.

Další úvahou je regulace vývoje meristému přes giberelinovou dráhu, jelikož bylo přímo potvrzeno, že jiné příbuzné AHL proteiny jmenovitě *AHL6* a *AHL29* interagují s DELLA represory (Favero et al., 2016). Existuje tedy také možnost, že i *AHL28* váže DELLA represory, ale to není možné potvrdit bez dalších experimentů.

Nejenom na fytohormonální dráhy může mít *AHL28* vliv. Například je možné, že mění meristém v kooperaci s genem *UPBI* nebo přímo s reaktivními formami kyslíku, ale kvůli ostatním fenotypovým projevům při ektopické overexpresi, jako je inhibice tvorby iniciací nebo narušení tvorby vodivých pletiv, je tato hypotéza méně pravděpodobná.

9.3. Tvorba postranních kořenů pod vlivem *AHL28*

Postranní kořeny vznikají mimo apikální meristém mateřského kořene z kompetentních buněk pericyklu, jež přiléhají xylémovým pólům (Dolan et al., 1993). Iniciace bočních kořenů je komplexní proces regulovaný sítí vnitřních a vnějších faktorů, jako je oscilace genové exprese, působení fytohormonů, dostupnost živin v pletivech a podmínky rhizosféry (Péret et al., 2009). Specializace buněk pro vznik postranních kořenů začíná již v přechodové zóně, kde vybrané buňky pericyklu získají kompetenci pro tvorbu iniciace (Xuan et al., 2020). V protoxylémových buňkách přilehlých pericyklu totiž dochází v pravidelných intervalech k oscilaci koncentrace auxinu (Obrázek 13). Tento signál se následně přenesení do sousední buňky pericyklu, v níž dojde k odstartování degradace Aux/IAA proteinů a tím ke změně rovnováhy ve prospěch ARF proteinů a jim podřízených genů, čímž získá buňka schopnost být buňkou zakladatelskou. Specificky v tomto případě je degradován IAA28 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 28) a je spuštěna exprese *ARF7* (*AUXIN RESPONSE FACTOR 7*) (Lavenus et al., 2013; Xuan et al., 2020). V diferenciací zóně kořene následuje auxinem řízená polarizace zakladatelských buněk, kdy jejich jádra migrují ke společné buněčné stěně, a proběhne první asymetrické dělení, jež iniciuje další příčné a podélné dělení a vznik primordia (Obrázek 13) (Casimiro et al., 2001;

Dolan et al., 1993; Malamy and Benfey, 1997). Na molekulární úrovni je tento proces podmíněn auxinovým signálem, který přes receptor TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1) vede cílenou degradaci auxinových represorů konkrétně IAA14/SLR1 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 14/SOLITARY ROOT) následovaný aktivací *ARF7* a *ARF19* (*AUXIN RESPONSE FACTOR 19*), jež spustí expresi pozitivních regulátorů kořenové iniciace *LBD16/ASL18* (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN 16/ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE 18*) a *LBD29/ASL16* (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN 29/ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE 16*) (Fukaki et al., 2005, 2002; Okushima et al., 2007; Zenser et al., 2001). Druhá dráha, jejíž funkčnost je podřízená degradaci IAA14/SLR1 a také dává vznik iniciacím, vede přes degradaci *IAA12/BDL* (*INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 12/BODENLOS*), která zapříčiní aktivaci *ARF5/MP* (*AUXIN RESPONSE FACTOR 5/MONOPTEROS*) (De Smet et al., 2010).

Na opačné straně spektra než auxin fungují cytokininy a opět rovnováha mezi jejich působením reguluje vývoj postranních kořenů. Zejména první fáze formování postranního kořene jsou náchylné na přítomnost cytokininů, neboť exprese enzymu biosyntetické dráhy cytokininů *IPT* (*ISOPENTENYL TRANSFERASE*) v buňkách pericyklu způsobuje narušení dělení zakladatelských buněk a následné formování primordia, díky negativní regulaci distribuce auxinových přenašečů PIN. Endogenně zvýšená koncentrace cytokininů v pericyklových buňkách vede ke vzniku rostlin s minimem kořenových iniciací a tento fenotyp nejde plně kompenzovat ani exogenním přidáním auxinu (Laplaze et al., 2007). Zároveň rostlina s konstitutivní expresí genů pro CKX (*CYTOKININ OXIDASE*), což jsou enzymy degradující cytokininy, má navýšený počet postranních kořenů a delší primární kořen a stejný fenotyp se dostaví i při mutaci v cytokininových receptorech AHK (Riefler et al., 2006; Werner et al., 2003). Přesný mechanismus působení cytokininů a genů jimi ovlivněných při vzniku postranních kořenů není zatím plně popsán, ale bylo zjištěno, že samotný auxin je silným regulátorem jejich působení, jelikož je schopen cíleně indukovat produkci enzymů CKX nebo naopak snížit hladinu receptorů AHK a transkripčních faktorů podléhajících cytokininové signalizaci *ARR* typu B (Chang et al., 2013; Laplaze et al., 2007; Paponov et al., 2008). Konkrétní příkladem auxinem podníceného potlačení cytokininové aktivity je přítomnost pseudo-histidinové fosfotransferázy AHP6 (*HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6*), která inhibuje pozitivní cytokininovou signalizaci v pericyklových buňkách, čímž umožňuje správnou orientaci PIN proteinů při tvorbě primordia (Moreira et al., 2013).

Zatím pouze jeden gen z rodiny *AHL* a jeho modulace v rostlině způsobily změnu fenotypu vývoje bočních kořenů. *AHL18* se zatím blíže nespecifikovaným způsobem podílí na správném

vývoji primordia. Nadprodukce genu vede ke zvýšení celkového počtu kořenových iniciací a zároveň k narušení jejich proporční distribuce v rámci jednotlivých zón kořene. Jednoduchý mutant *ahl18* zase obsahuje menší počet bočních kořenů a hlavně větší množství nevyvíjejících se primordií, což jsou nevyvíjející se iniciace ve větvené zóně primárního kořene (Šírl et al., 2020).

Nejprve reflektujeme naše fenotypové výsledky s příbuzným *AHL18*. Když porovnáme rostliny s navýšenou expresí *AHL18* a *AHL28* je vidět, že mají přesně obrácený trend, co se počtu iniciací týče, takže jejich působení je v tomto ohledu antagonistické. Přestože se mutanti ztratí v genu *AHL18* a se sníženou expresí *AHL28* (Col-0) chovají protichůdně vzhledem k počtu bočních kořenů, tak u nich dochází v obou případech k nárůstu počtu nevyvíjejících se primordií, což by mohlo značit, že jsou zapojeny do stejné regulační dráhy pouze na jiné úrovni. Oba geny jsou zároveň exprimovány v odlišných pletivech a jsou buněčně autonomní, takže zřejmě tvoří společně oligomery. Objasnění vzájemné interakce těchto genů a jejich zapojení do regulační sítě vývoje kořenového systému by mohl v budoucnu blíže osvětlit některé aspekty fungování iniciace bočních kořenů.

Výrazným fenotypovým znakem zkoumaných linií je fluktuující počet postranních kořenů a celkově počet jejich iniciací v závislosti na míře exprese genu *AHL28*. Přesný vliv a pozici genu *AHL28* v procesu iniciace není možno v tuto chvíli stanovit, ale jsou zde určité indicie, že by mohl být i v tomto případě propojen s kontrolou auxin-cytokininové odpovědi. Rostliny nadprodukující *AHL28* mají výrazně zkrácený apikální meristém, primární kořen a nástup diferenciace uspíšen, což připomíná projevy rostlin s nerovnováhou ve fytohormonech (Dello Ioio et al., 2007). Místem s nejsilnější expresí tohoto genu jsou buňky primární kůry v přechodové zóně, kde některé buňky pericyklu získávají kompetenci k iniciaci primordií na základě auxinové oscilace, kterou je možné narušit přidáním exogenního či endogenního cytokininu. Pokud tedy pericykl nedostane kompetenci k vytvoření zakladatelské buňky, nevytváří dále v kořeni primordia. Lze spekulovat, že právě tohoto kroku se *AHL28* v rámci zapojení do cytokininové dráhy účastní, přestože se přímo nevyskytuje v buňkách pericyklu a možná ani není cílený na tvorbu iniciací. Poměr mezi meristematickou a diferenciální zónou je u rostlin s nadbytkem *AHL28* velice převážen na stranu diferenciace, z čehož může vyplývat, že je urychlen právě nástup diferenciace. Zrychlený nástup diferenciace se výrazně projevuje z hlediska tvaru a rozsahu elongace buněk za diferenciální zónou, jako příklad je dokumentována endodermis. Je možné, že právě posun longitudinální kořenové zonace a zkrácení elongační zóny může být příčinou narušení iniciace.

Vzhledem k nepřítomnosti proteinu AHL28 v pletivech přímo se podílejících na standardním vývoji primordií, nelze odhadovat, do jaké míry je působení ektopicky exprimovaného AHL28 shodné s přirozeným regulačním mechanismem iniciace. V každém případě je pozorovaný fenotyp, kdy je iniciace efektivně potlačena jediným genem velmi atraktivní pro další zkoumání.

K ověření vlivu *AHL28* na auxinovou signalizaci byly vytvořeny kříženci s linií *DR5::GUS*, ale nepodařilo se nám vyselektovat správné transformanty. Je tedy nutné tento postup upravit a znovu provést, jelikož jeho výsledky by nám mohly pomoci osvětlit procesy spojené s potlačením iniciací.

9.4. Funkce *AHL28* při tvorbě vodivých pletiv

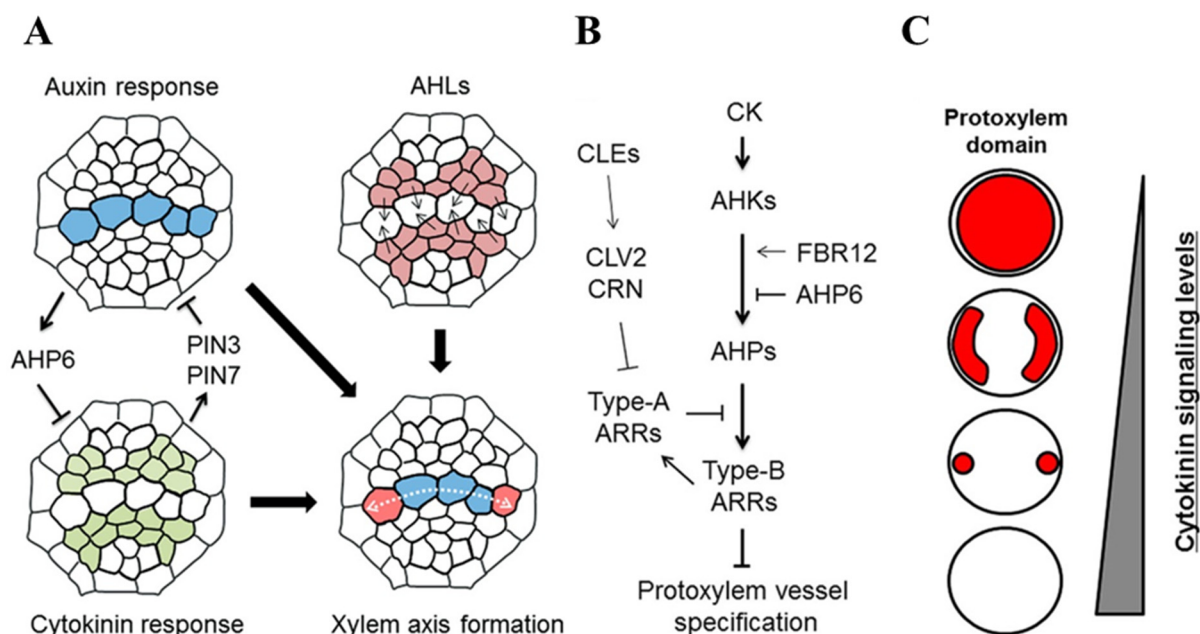
Nepostradatelnou strukturou rostlinného těla jsou vodivá pletiva, která slouží k transportu vody, živin a signálních látek na větší vzdálenosti. Jednotlivé složky, tedy xylém, floém a prokambium, se vyvíjejí v prostorově specifickém uspořádání, které je předurčeno již v apikálním meristému a je ovlivňováno komplexním regulačním mechanismem. Výsledná prostorová organizace xylému u *Arabidopsis* je řada buněk tvořící desku, jež má na vnější straně dvě protoxylémové cévy ohraničující převážně tři do řady uspořádané metaxylémové cévy (Aloni, 1995; Busse and Evert, 1999; Kondo et al., 2014; Mähönen et al., 2006).

Auxin-cytokininová rovnováha je opět jedním z hlavních regulátorů formování xylémové desky (Aloni, 1995). Lokalizace auxinového maxima v proto a metaxylémové oblasti, je ohraničena vysokou hladinou cytokininů v prokambiu. Auxin tedy podporuje diferenciaci xylému, kdežto cytokininy jeho funkci do určité míry omezují, ale jsou klíčové pro rozsah prokambia a jeho dělení (Bishopp et al., 2011a). Auxinové maximum v xylému je vytvořeno polárním tokem auxinu z nadzemní části rostliny a je udržováno auxinovými přenašeči PIN3 (PIN FORMED 3) a PIN7 (PIN FORMED 7), což aktivuje expresi, již jednou zmiňované pseudo-histidinové fosfotransferázy AHP6, která funguje jako negativní regulátor cytokininové dráhy (Bishopp et al., 2011a; Mähönen et al., 2006). Na druhé straně cytokininy svojí přítomností v prokambiu přesně vymezují prostor vzniku xylémových cév navýšením exprese auxinového přenašeče PIN7, kterým udrží auxinový tok pouze v oblasti xylémové desky (Obrázek 14) (Bishopp et al., 2011a, 2011b). Poškozením cytokininové signalizační kaskády například mutací jejich receptorů AHK nebo jimi podřízených transkripčních faktorů *ARR* typu B, dojde v rostlině z tvorbě ektopických protoxylémových cév. Transkripční faktory *ARR* se dělí na dva typy A a B, kdy *ARR-B* jsou pozitivní regulátory v odpovědi na cytokininy, a spouštějí expresi naopak negativně fungujících regulátorů *ARR-A*, které zpětnovazebnou

smyčkou inhibují expresi *ARR-B*. (Obrázek 14) (Kondo et al., 2011; Mähönen et al., 2006; Scheres et al., 1995). Přesně opačný účinek, tedy ztrátu xylémových cév, má exogenní dodání cytokininů nebo ektopická exprese enzymů pro jejich degradaci CKX (Obrázek 14) (Mähönen et al., 2006; Yokoyama et al., 2007). Cytokinininy jsou zároveň pod kontrolou CLE proteinů (CLAVATA3/ESR-RELATED), které inhibují *ARR-A* a jejich negativní zpětnovazebnou smyčku, čímž je navýšena funkce *ARR-B* ve prospěch cytokininů vůči auxinu a nedochází k vývoji xylémových cév (Obrázek 14) (Kondo et al., 2011).

Další podstatnou součástí vymezení vzájemných hranic vodivých pletiv je funkce genu *SHR* (*SHORT ROOT*), který nejenom že uděluje identitu buňkám endodermis a primární kůry, ale zároveň reguluje specifikaci xylémových cév, neboť ztrátový mutant tohoto genu produkuje metaxylémové cévy v oblasti protoxylémových (Carlsbecker et al., 2010; Helariutta et al., 2000). *SHR* je známý pro své buněčně neautonomní působení, kdy se pomocí SCR (*SCARECROW*), přesouvá z místa své exprese, což je střední válec, do místa svého působení tedy endodermis. Tímto transportem dojde k navýšení exprese *miR165* a *miR166*, které se přesunou přesně v opačném směru z endodermis do vnějšího okraje stéle, čímž v tom místě dojde k narušení exprese genů rodiny *HD-ZIPIII*, které definují metaxylém. Hladina genů *HD-ZIPIII* tedy určuje, jestli se v daném místě vyvine metaxylém či protoxylém (Carlsbecker et al., 2010; Miyashima et al., 2011).

Rodina *AHL* genů, přesněji její dva členové *AHL3* a *AHL4* se také aktivně podílejí na vývoji rozhraní xylémové desky a prokambia. Vyřazením jednotlivých genů dojde k tvorbě nových meta a protoxylémových cév v oblasti prokambia (Obrázek 14). Dvojitý mutant *ahl3ahl4* však tento fenotyp nemá. Oba proteiny *AHL3* a *AHL4* fungují buněčně neautonomně, kdy se *AHL3* přesouvá z endodermis do prokambia a xylémových prekurzorů a *AHL4* migruje z prokambia do xylémových prekurzorů a endodermis. Právě tento přenos je zřejmě klíčový pro jejich správné fungování ve formaci xylémové desky. Také bylo potvrzeno, že spolu tvoří hetero oligomery. Jejich vztah k regulaci fytohormonů je stále nejistý, jelikož při umístění na exogenně dodaný cytokinin reagovali mutanti *ahl4* i *ahl3* shodně jako původní genotyp, tedy nevytvářeli xylémové cévy (Zhou et al., 2013).



Obrázek 14: Regulace vzniku vodivých pletiv. (A) Schéma jednotlivých navzájem se ovlivňujících faktorů formující xylémovou desku. (B) Molekulární mechanismus vývoje protoxylémových cév. (C) Koncentrace a lokalizace cytokininů při formaci protoxylému ve středním válci. Převzato z (Kondo et al., 2014)

Určení funkce *AHL28* ve vývoji vodivých pletiv je značně problematické, jelikož je tento proces velice komplexní. Je třeba také zvažovat možné důsledky ektopické exprese konstitutivního promotoru. Dojde-li totiž k expresi *AHL28* mimo standardní expresní doménu, může to zapříčinit narušení tvorby trimerů ostatních AHL proteinů a jejich regulační úlohy. Zároveň žádný dosud v literatuře popsáný mutant nekopíruje všechny deficity, které má námi popsaná linie. Dochází u ní ke zkrácení meristematické zóny a celkové délky kořene, urychlenému nástupu diferenciaci a k tvorbě přerušovaných a ektopických indukovaných protoxylémových svazků, jež jsou v místech kde má být přítomen metaxylém.

Nejvíce se asi znova nabízí úvaha o možném propojení s cytokininy a jejich regulační drahou, ale je také dost možné, že fungují nezávisle. Lze ovšem také zvažovat, že narušení kontinuity xylémových cév má co dočinění s auxinovým transportem a jeho úloze v definici prokambia a kontinua cévních elementů. Právě narušení auxinového toku z důvodu nepřítomnosti několika přenašečů z rodiny *AUX/LAX* narušuje kontinuitu xylémových cév (Fàbregas et al., 2015). Pokud uvažíme, že *AHL28* má určitou funkci při vývoji vodivých pletiv a není to pouze důsledek jeho ektopické exprese, tak se nabízí možnost interakce s proteiny *AHL3* a *AHL4*. Zde však narážíme na fakt, že mají vzájemně odlišné expresní domény a jelikož je *AHL28* buněčně autonomní není úplně pravděpodobné, že by spolu vzájemně dokázali formovat oligomery a spolupracovali na vytváření xylému.

9.5. Plánované navazující experimenty

Dosavadní výsledky naznačují, že AHL28 může být velmi potentním regulátorem vývoje kořenového systému. Bohužel není možné určit jeho regulační funkci a dokonce ani s určitostí zacílit na konkrétní vývojové procesy. Proto je zapotřebí provést další experimenty, jež by mohly v tomto ohledu pomoci. Nejprve bude nutné znovu provést qPCR, ověřit tím míru exprese u jednotlivých linií a vytvořit skutečného knock-out mutantu *ahl28* například pomocí CRISPR-Cas editace. Dále budeme muset vyřešit problém s pravděpodobnou kosupresí, ke které dochází u konstitutivní exprese pod promotorem *35S* na pozadí Col-0, což snad půjde odstranit pomocí inducibilního systému s jiným typem promotoru, jež bude i využit k pletivově specifické overexpresi AHL28. Propojení s auxin-cytokininovou rovnováhou bude nejprve detekováno úspěšnějším spojením linií s markerem auxinové signalizace *DR5::GUS* (přímou transformací použitých linií) a dále pak vytvořením kombinací mutantů v potenciálně souvisejících regulačních drahách (auxin, cytokinin), jako jsou například *arf7*, *arf19* nebo *ahk4*.

10. Závěr

Úspěšnou lokalizací místa exprese i tvorby proteinu jsme potvrdili a hlavně zpřesnili predikovaná expresní data pro gen *AHL28*. Dále se podařilo najít výrazné fenotypové změny u mutantů s expresí *AHL28* pod konstitutivním promotorem *35S* na různém transformačním pozadí (Col-0, *rdr6*), o němž se zároveň domníváme, že má vliv na hladinu ektopické exprese u námi používaných linií. V průběhu práce jsme také zjistili i kvůli nedostatku fenotypových rozdílů, že veřejně dostupná inzerční linie SAIL_646_A02 pro *AHL28* zřejmě nemá daný gen vyřazený s funkce, a proto asi bude nutné pro další práci vytvořit mutantu *ahl28*.

Z doložených lokalizačních i fenotypových výsledků je patrné, že *AHL28* opravdu svojí funkcí ovlivňuje tvorbu a vývoj kořenové systému u *Arabidopsis thaliana*. Jeho přesné zařazení do signalizační sítě zatím bohužel není možné určit.

11. Použitá literatura

- Aloni, R., 1995. The Induction of Vascular Tissues by Auxin and Cytokinin. *Plant Horm.* 531–546. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-011-0473-9_25
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., Ullrich, C.I., 2006. Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture : Regulating Vascular Differentiation , Lateral Root Initiation , Root Apical Dominance and Root Gravitropism. *Ann. Bot.* 883–893. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl027>
- Ansbel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Wiley, C.J., Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Allison, R.D., Bittner, M., Blackshaw, S., 1987. *Current Protocols in Molecular Biology* Current Protocols in Molecular Biology.
- Aravind, L., Landsman, D., 1998. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 26, 4413–4421. <https://doi.org/10.1093/nar/26.19.4413>
- Baluška, F., Volkmann, D., Barlow, P.W., 1996. Specialized Zones of Development in Roots : View from the Cellular Level. *Plant Physiol.* 3–4. <https://doi.org/10.1104/pp.112.1.3>
- Bishopp, A., Help, H., El-showk, S., Weijers, D., Scheres, B., Ma, A.P., 2011a. A Mutually Inhibitory Interaction between Auxin and Cytokinin Specifies Vascular Pattern in Roots. *Curr. Biol.* 917–926. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.017>
- Bishopp, A., Lehesranta, S., Vatén, A., Help, H., El-Showk, S., Scheres, B., Helariutta, K., Mähönen, A.P., Sakakibara, H., Helariutta, Y., 2011b. Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. *Curr. Biol.* 21, 927–932. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.049>
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., Scheres, B., 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 39–44.
- Busse, J.S., Evert, R.F., 1999. Vascular Differentiation and Transition in the Seedling of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Int. J. Plant Sci.* 160, 241–251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/314117>
- Carlsbecker, A., Lee, J., Roberts, C.J., Dettmer, J., Lehesranta, S., Zhou, J., Thitamadee, S., Campilho, A., Sebastian, J., Lindgren, O., Moreno-risueno, M.A., Vate, A., Benfey, P.N., Bowman, J.L., 2010. Cell signalling by microRNA165 / 6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 465. <https://doi.org/10.1038/nature08977>
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham,

- N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J., Bennett, M., 2001. Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. *Plant Cell* 13, 843–852. <https://doi.org/DOI:https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.843>
- Clowes, F.A., 1954. NUCLEIC ACIDS IN ROOT APICAL MERISTEMS OF. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1956.tb05264.x>
- De Smet, I., Lau, S., Voß, U., Vanneste, S., Benjamins, R., Rademacher, E.H., 2010. Bimodular auxin response controls organogenesis in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2705–2710. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915001107>
- Dello Ioio, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., Sabatini, S., 2007. Report Cytokinins Determine Arabidopsis Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. *Curr. Biol.* 678–682. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.047>
- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P., Sabatini, S., 2008. A Genetic Framework for the Control of Cell Division and Differentiation in the Root Meristem. *Science* (80-.). 1380–1385. <https://doi.org/10.1126/science.1164147>
- Deuschle, K., Chaudhuri, B., Okumoto, S., Lager, I., Lalonde, S., Frommer, W.B., 2006. Rapid Metabolism of Glucose Detected with FRET Glucose Nanosensors in Epidermal Cells and Intact Roots of Arabidopsis RNA-Silencing Mutants. *Plant Cell* 18, 2314–2325. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044073>
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., Scheres, B., 1993. Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* 84, 71–84.
- Dubreucq, B., Grandjean, O., Runions, J., Truernit, E., 2008. High-Resolution Whole-Mount Imaging of Three-Dimensional Tissue Organization and Gene Expression Enables the Study of Phloem Development and Structure in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 1494–1503. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056069>
- Dubrovsky, J.G., Sauer, M., Napsucialy-mendivil, S., Ivanchenko, M.G., Shishkova, S., Celenza, J., Benkova, E., 2008. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0712307105>
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C., 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19, 1991. <https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349>
- Elmayan, T., Balzergue, S., Béon, F., Bourdon, V., Daubremet, J., Guénet, Y., Mourrain, P.,

- Palauqui, J., Vernhettes, S., Vialle, T., Wostrikoff, K., Vaucheret, H., Cellulaire, L.D.B., Cedex, V., 1998. Arabidopsis Mutants Impaired in Cosuppression. *Plant Cell* 10, 1747–1757. <https://doi.org/https://doi.org/10.1105/tpc.10.10.1747>
- Fàbregas, N., Formosa-jordan, P., Confraria, A., Siligato, R., Alonso, J.M., Swarup, R., Bennett, M.J., 2015. Auxin Influx Carriers Control Vascular Patterning and Xylem Differentiation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005183>
- Favero, D.S., Jacques, C.N., Iwase, A., Le, K.N., Zhao, J., Sugimoto, K., Neff, M.M., 2016. SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME B4-#3 Represses Genes Associated with Auxin Signaling to Modulate Hypocotyl Growth. *Plant Physiol.* pp.00405.2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00405>
- Favero, D.S., Kawamura, A., Shibata, M., Wigge, P.A., Neff, M.M., Sugimoto, K., Favero, D.S., Kawamura, A., Shibata, M., Takebayashi, A., Jung, J., 2020. AT-Hook Transcription Factors Restrict Petiole Growth by Antagonizing PIFs. *Curr. Biol.* 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.02.017>
- Favero, D.S., Le, K.N., Neff, M.M., 2017. Brassinosteroid signaling converges with SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME B4-#3 to influence the expression of SMALL AUXIN UP RNA genes and hypocotyl growth. *Plant J.* 89, 1133–1145. <https://doi.org/10.1111/tpj.13451>
- Fujimoto, S., Matsunaga, S., Yonemura, M., Uchiyama, S., Azuma, T., Fukui, K., 2004. Identification of a novel plant MAR DNA binding protein localized on chromosomal surfaces. *Plant Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1007/s11103-004-3249-5>
- Fukaki, H., Nakao, Y., Okushima, Y., Theologis, A., Tasaka, M., Gene, P., 2005. Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT / IAA14 alters lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 382–395. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02537.x>
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., Tasaka, M., 2002. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT / IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant J.* 29, 153–168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01201.x>
- Gupta, R., Webster, C.I., Gray, J.C., 1998. Characterisation and promoter analysis of the *Arabidopsis* gene encoding high-mobility-group protein HMG-I/Y. *Plant Mol. Biol.* 36, 897–907. <https://doi.org/10.1023/A:1005928219895>
- Hejátko, J., Benkova, E., 2009. Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Mol. Biol.* 383–396. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9393-6>

- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M., Benfey, P.N., 2000. The SHORT-ROOT Gene Controls Radial Patterning of the Arabidopsis Root through Radial Signaling. *Cell* 101, 555–567.
- Huth, J.R., Bewley, C.A., Nissen, M.S., Evans, J.N.S., Reeves, R., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., 1997. The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat. Struct. Biol.* 4, 657–665. <https://doi.org/10.1038/nsb0897-657>
- Chang, L., Ramireddy, E., Schmülling, T., 2013. Lateral root formation and growth of Arabidopsis is redundantly regulated by cytokinin metabolism and signalling genes. *J. Exp. Bot.* 64, 5021–5032. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert291>
- Jeong, H.N., Jin, H., Zhi, S., Zuo, F., Hee, D., Pill, L., Song, S., Gyu, H., 2020. AT - hook motif nuclear - localized genes , confers salt tolerance in transgenic *Zoysia japonica*. *Plant Biotechnol. Rep.* <https://doi.org/10.1007/s11816-020-00606-9>
- Jia, Q., Zhu, J., Xu, X., Lou, Y., Zhang, Z., Zhang, Z., Yang, Z., 2015. Arabidopsis AT-hook Protein TEK Positively Regulates the Expression of Arabinogalactan Proteins for Nexine Formation. *Mol. Plant* 8, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.10.001>
- Karami, O., Rahimi, A., Mak, P., Horstman, A., Boutilier, K., 2020. An Arabidopsis AT-hook motif nuclear protein mediates somatic embryogenesis and coinciding genome duplication. *bioRxiv* 1–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.01.03.892869>
- Kondo, Y., Hirakawa, Y., Kieber, J.J., Fukuda, H., 2011. CLE Peptides can Negatively Regulate Protoxylem Vessel Formation via Cytokinin Signaling Special Issue. *Plant Cell Physiol.* 52, 37–48. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq129>
- Kondo, Y., Tamaki, T., Fukuda, H., 2014. Regulation of xylem cell fate. *Front. Plant Sci.* 5, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00315>
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodriguez, M.B., Offringa, R., Graham, N., Doumas, P., Frim, J., Bogusz, D., Beeckman, T., Bennett, M., 2007. Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation. *Plant Cell* 19, 3889–3900. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055863>
- Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc, S., Smet, I. De, Fukaki, H., Beeckman, T., Bennett, M., Laplaze, L., 2013. Lateral root development in Arabidopsis : fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci.* 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.006>
- Lee, K., Seo, P.J., 2017. Coordination of matrix attachment and ATP-dependent chromatin

- remodeling regulate auxin biosynthesis and Arabidopsis hypocotyl elongation. PLoS One 12, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181804>
- Lim, P.O., Kim, Y., Breeze, E., Koo, J.C., Woo, H.R., Ryu, J.S., Park, D.H., Beynon, J., Tabrett, A., Buchanan-Wollaston, V., Nam, H.G., 2007. Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants. Plant J. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03317.x>
- Lin, L., Nakano, H., Nakamura, S., Uchiyama, S., Fujimoto, S., Matsunaga, S., Kobayashi, Y., Ohkubo, T., Fukui, K., 2007. Crystal Structure of Pyrococcus horikoshii ° Resolution PPC Protein at 1 . 60 Å. PROTEINS Struct. Funct. Bioinforma. 507, 505–507. <https://doi.org/10.1002/prot>
- Lobet, G., Pagès, L., Draye, X., 2017. A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. Plant Physiol. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179895>
- Lou, Y., Xu, X., Zhu, J., Gu, J., Blackmore, S., Yang, Z., 2014. The tapetal AHL family protein TEK determines nexine formation in the pollen wall. Nat. Commun. 5, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms4855>
- Lu, H., Zou, Y., Feng, N., 2010. Overexpression of AHL20 negatively regulates defenses in arabidopsis. J. Integr. Plant Biol. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00969.x>
- Mähönen, A.P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K.M., 2006. Cytokinin Signaling and Its Inhibitor AHP6 Regulate Cell Fate During Vascular Development. Science (80-.). 311.
- Malamy, J.E., Benfey, P.N., 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. Development 44, 33–44.
- March-Díaz, R., Reyes, J.C., 2009. The beauty of being a variant: H2A.Z and the SWR1 complex in plants. Mol. Plant 2, 565–577. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp019>
- Matsushita, A., Furumoto, T., Ishida, S., Takahashi, Y., 2007. AGF1, an AT-Hook Protein, Is Necessary for the Negative Feedback of AtGA3ox1 Encoding GA 3-Oxidase. PLANT Physiol. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093542>
- Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y., Ohashi, Y., 1996. Efficient Promoter Cassettes for Enhanced Expression of Foreign Genes in Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants. Plant Cell Physiol. 37, 49–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a028913>
- Miyashima, S., Koi, S., Hashimoto, T., Nakajima, K., 2011. Non-cell-autonomous microRNA165 acts in a dose- dependent manner to regulate multiple differentiation status in the Arabidopsis root. Development 2313, 2303–2313.

<https://doi.org/10.1242/dev.060491>

- Moreira, S., Bishopp, A., Carvalho, H., Campilho, A., 2013. AHP6 Inhibits Cytokinin Signaling to Regulate the Orientation of Pericycle Cell Division during Lateral Root Initiation. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056370>
- Motte, H., Vanneste, S., Beeckman, T., 2019. Molecular and Environmental Regulation of Root Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 1–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100423>
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980. *Nucleic Acids Research* 8, 4321–4326.
- Ng, K.H., Yu, H., Ito, T., 2009. AGAMOUS controls GIANT KILLER, a multifunctional chromatin modifier in reproductive organ patterning and differentiation. *PLoS Biol.* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000251>
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., Tasaka, M., 2007. ARF7 and ARF19 Regulate Lateral Root Formation via Direct Activation of LBD / ASL Genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 118–130. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047761>
- Overvoorde, P., Fukaki, H., Beeckman, T., 2010. Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537>
- Pacheco-Escobedo, M.A., Ivanov, V.B., Ransom-Rodríguez, I., Arriaga-Mejía, G., Ávila, H., Baklanov, I.A., Pimentel, A., Corkidi, G., Doerner, P., Dubrovsky, J.G., Alvarez-buylla, E.R., Garay-arroyo, A., 2016. Longitudinal zonation pattern in Arabidopsis root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Ann. Bot.* 763–776. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw101>
- Paponov, I.A., Paponov, M., Teale, W., Menges, M., Chakrabortee, S., 2008. Comprehensive Transcriptome Analysis of Auxin Responses in Arabidopsis. *Mol. Plant* 1. <https://doi.org/10.1093/mp/ssm021>
- Péret, B., Rybel, B. De, Casimiro, I., Benkova, E., Swarup, R., Laplace, L., Beeckman, T., Bennett, M.J., 2009. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.05.002>
- Que, Q., Wang, H., English, J.J., Jorgensen, R.A., 1997. The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. *Plant Cell* 9, 1357–1368. <https://doi.org/https://doi.org/10.1105/tpc.9.8.1357>

- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Lekanne, R.H., Moorman, A.F.M., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339, 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4)
- Reeves, R., Nissen, M.S., 1990. The A T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins . *J. Biol. Chem.* 265, 8573–8582.
- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., Schmu, T., 2006. Arabidopsis Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth , Leaf Senescence , Seed Size , Germination , Root Development , and Cytokinin Metabolism. *Plant Cell* 18, 40–54. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037796.1>
- Serino, G., Deng, X.-W., 2003. The COP9 SIGNALOSOME : Regulating Plant Development Through the Control of Proteolysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 165–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134847>
- Scheres, B., Laurenzio, L. Di, Willemsen, V., Hauser, M., Janmaat, K., Weisbeek, P., Benfey, P.N., 1995. Mutations affecting the radial organisation of the Arabidopsis root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 62, 53–62.
- Street, I.H., Shah, P.K., Smith, A.M., Avery, N., Neff, M.M., 2008. The AT-hook-containing proteins SOB3/AHL29 and ESC/AHL27 are negative modulators of hypocotyl growth in Arabidopsis. *Plant J.* 54, 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03393.x>
- Šírl, M., Šnajdrová, T., Gutiérrez-alanís, D., Dubrovsky, J.G., Vielle-calzada, J.P., Kulich, I., Soukup, A., 2020. At-Hook Motif Nuclear Localised Protein 18 as a Novel Modulator of Root System Architecture. *Int. J. Mol. Sci.* 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21051886>
- Teixeira, J.A.S., Tusscher, K.H., 2019. The Systems Biology of Lateral Root Formation : Connecting the Dots. *Mol. Plant* 12, 784–803. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.03.015>
- Tian, Q., Reed, J.W., 1999. Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana. *Development* 721, 711–721.
- Tsukagoshi, H., Busch, W., Benfey, P.N., 2010. Transcriptional Regulation of ROS Controls Transition from Proliferation to Differentiation in the Root. *Cell* 143, 606–616. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.020>
- Ubeda-Tomás, S., Casimiro, I., Beemster, G.T.S., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J., Bennett, M.J., 2016. Report Gibberellin Signaling in the Endodermis Controls Arabidopsis Root Meristem Size. *Nat. Cell Biol.* 1194–1199. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.023>
- Ubeda-Tomás, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beemster, G.T.S., Hedden, P., Bhalerao, R., Bennett, M.J., 2008. Root growth in Arabidopsis requires gibberellin /

- DELLA signalling in the endodermis. *Nat. Cell Biol.* 10. <https://doi.org/10.1038/ncb1726>
- Vaucheret, H., 2005. MicroRNA-Dependent Trans-Acting siRNA Production. *Sci. STKE* 1–4. <https://doi.org/10.1126/stke.3002005pe43>
- Verbelen, J.-P., Cnodder, T. De, Le, J., Vissenberg, K., Baluška, F., 2006. The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities. *Plant Signal. Behav.* 2324. <https://doi.org/10.4161/psb.1.6.3511>
- Weijers, D., Benkova, E., Katja, E., Schlereth, A., Kientz, M., Wilmoth, J.C., Reed, J.W., Ju, G., 2005. Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux / IAA transcriptional regulators. *EMBO J.* 24, 1874–1885. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600659>
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., Schmülling, T., 2003. Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* Plants Show Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *Plant Cell* 15, 2532–2550. <https://doi.org/10.1105/tpc.014928>.)
- Won, C., Shen, X., Mashiguchi, K., Zheng, Z., Dai, X., Cheng, Y., Kasahara, H., Kamiya, Y., Chory, J., Zhao, Y., 2011. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 18518–18523. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108436108>
- Wong, M.M., Bhaskara, G.B., Wen, T.N., Lin, W.D., Nguyen, T.T., Chong, G.L., Verslues, P.E., 2019. Phosphoproteomics of *Arabidopsis* Highly ABA- required for stress growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1819971116>
- Xiao, C., Chen, F., Yu, X., Lin, C., Fu, Y.F., 2009. Over-expression of an AT-hook gene, AHL22, delays flowering and inhibits the elongation of the hypocotyl in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9507-9>
- Xu, Y., Gan, E.S., Ito, T., 2013a. The AT-hook/PPC domain protein TEK negatively regulates floral repressors including MAF4 and MAF5. *Plant Signal. Behav.* 8. <https://doi.org/10.4161/psb.25006>
- Xu, Y., Wang, Y., Stroud, H., Gu, X., Sun, B., Gan, E., Ng, K., 2013b. Report A Matrix Protein Silences Transposons and Repeats through Interaction with Retinoblastoma-Associated Proteins. *Curr. Biol.* 23, 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.030>
- Xu, Y., Wang, Y., Stroud, H., Gu, X., Sun, B., Gan, E.S., Ng, K.H., Jacobsen, S.E., He, Y., Ito, T., 2013c. A matrix protein silences transposons and repeats through interaction with retinoblastoma-associated proteins. *Curr. Biol.* 23, 345–350.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.030>

- Xuan, W., Gernier, H. De, Beeckman, T., 2020. The dynamic nature and regulation of the root clock. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.181446>
- Yadeta, K. a., Hanemian, M., Smit, P., Hiemstra, J. a., Pereira, A., Marco, Y., Thomma, B.P.H.J., 2011. DNA-Binding Protein AHL19 Mediates Verticillium Wilt Resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 1582–1591. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-11-0090>
- Yokoyama, A., Yamashino, T., Amano, Y., Tajima, Y., Imamura, A., Sakakibara, H., Mizuno, T., 2007. Type-B ARR Transcription Factors , ARR10 and ARR12 , are Implicated in Cytokinin-Mediated Regulation of Protoxylem Differentiation in Roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 48, 84–96. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcl040>
- Yu, Q., Tian, H., Yue, K., Liu, J., Zhang, B., Li, X., Ding, Z., 2016. A P-Loop NTPase Regulates Quiescent Center Cell Division and Distal Stem Cell Identity through the Regulation of ROS Homeostasis in *Arabidopsis* Root. *PLoS Genet.* 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006175>
- Yun, J., Kim, Y.S., Jung, J.H., Seo, P.J., Park, C.M., 2012. The AT-hook motif-containing protein AHL22 regulates flowering initiation by modifying FLOWERING LOCUS T chromatin in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318477>
- Zenser, N., Ellsmore, A., Leasure, C., Callis, J., 2001. Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Plant Cell* 2001. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.211312798>
- Zhao, J., Favero, D.S., Peng, H., Neff, M.M., 2013. *Arabidopsis thaliana* AHL family modulates hypocotyl growth redundantly by interacting with each other via the PPC/DUF296 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1219277110>
- Zhao, J., Favero, D.S., Qiu, J., Roalson, E.H., Neff, M.M., 2014. Insights into the evolution and diversification of the AT-hook Motif Nuclear Localized gene family in land plants. *BMC Plant Biol.* 14, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0266-7>
- Zhou, J., Wang, X., Lee, J.-Y., Lee, J.-Y., 2013. Cell-to-Cell Movement of Two Interacting AT-Hook Factors in *Arabidopsis* Root Vascular Tissue Patterning. *Plant Cell.* <https://doi.org/10.1105/tpc.112.102210>